

**Modulation der angeborenen Immunität  
in der Pathophysiologie der Chemotherapie-  
induzierten intestinalen Mukositis**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für  
Biologie

an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Magdalena Frank, geb. Klepak  
aus Knurow, Polen

Oktober 2015

---

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikums Essen und der Universität Duisburg-Essen in der Arbeitsgruppe "Experimentelle Gastroenterologie" unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. Elke Cario durchgeführt.

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Elke Cario

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Bertram Opalka

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Herr Prof. Dr. rer. nat. Peter Bayer

Zusätzlicher Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Dirk Haller, TU München

Tag der mündlichen Prüfung: 08.04.2016

---

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden zum Teil finanziell gefördert durch:

- Deutsche Forschungsgemeinschaft – DFG  
(Sachbeihilfen: CA 226/8-1; CA 226/9-1; CA 226/4-3; E. Cario)
  
- Interne Forschungsförderung – IFORES  
(Bonusprogramm; E. Cario)

---

**Teile der vorliegenden Dissertation wurden zuvor publiziert:**

**Originalpublikationen**

1. **Frank, M., Hennenberg, E. M., Eyking, A., Rünzi, M., Gerken, G., Scott, P., Parkhill, J., Walker, A., Cario, E.** (2015).  
“TLR Signaling Modulates Side Effects of Anticancer Therapy in the Small Intestine.”  
*J Immunol* 194(4):1983-95.
  
2. **Ey, B., Eyking, A., Klepak, M., Salzman, N., Göthert, J., Rünzi, M., Schmid, K. W., Gerken, G., Podolsky, D. K., Cario, E.** (2013).  
“Loss of TLR2 worsens spontaneous colitis in MDR1A deficiency through commensally induced pyroptosis.”  
*J Immunol* 190(11):5676-88.

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	5
Abbildungsverzeichnis .....	8
Tabellenverzeichnis .....	11
Abkürzungsverzeichnis .....	12
1 Einleitung .....	19
1.1 Chemotherapie-induzierte intestinale Mukositis .....	19
1.1.1 Fünf-Phasen-Modell .....	19
1.1.2 Unzureichende Therapieansätze .....	21
1.2 Mukosales Immunsystem .....	21
1.3 Toll- <i>Like</i> Rezeptoren (TLR) .....	24
1.3.1 Signaltransduktion .....	25
1.3.2 Physiologische Funktion .....	28
1.4 Mikrobiom .....	29
1.5 ABC-Transporter P-Glycoprotein (P-GP) .....	31
1.5.1 Substrate und Inhibitoren .....	32
1.5.2 Signaltransduktion .....	35
1.5.3 Genetischer Verlust .....	40
1.5.4 Polymorphismen .....	41
1.6 Zielsetzung .....	44
2 Material und Methoden .....	45
2.1 Materialien, Chemikalien und Geräte .....	45
2.1.1 Materialien .....	45
2.1.2 Reagenzien und Chemikalien .....	48
2.1.3 Größenstandards .....	52

2.1.4	Lösungen und Puffer.....	52
2.1.5	Antikörper und Primer .....	54
2.1.6	Kits.....	57
2.1.7	Zellkulturmedien.....	58
2.1.8	Geräte.....	59
2.1.9	Software.....	62
2.1.10	Datenbank .....	63
2.2	Methoden .....	63
2.2.1	Zellkultur .....	63
2.2.2	Mäuse und Tierhaltung .....	66
2.2.3	Genexpressionsanalyse.....	85
2.2.4	Proteinexpressionsanalyse .....	87
2.2.5	Durchflusszytometrie .....	91
2.2.6	Funktionelle Assays.....	95
2.2.7	Statistik .....	98
3	Ergebnisse .....	99
3.1	Genotypisierung von unterschiedlichen Mausstämmen .....	99
3.2	Phänotypisierung von Mäusen mit MTX-induzierter intestinaler Mukositis .....	100
3.2.1	Klinische und histopathologische Parameter .....	101
3.2.2	Oxidativer Stress.....	107
3.2.3	Inflammatorische Genotoxizität.....	108
3.2.4	Mikrobiota .....	110
3.2.5	Genexpression.....	111
3.2.6	P-gp-Expression .....	120
3.3	Wirkung der TLR2-Stimulation auf MTX-induzierte Toxizität <i>in-vitro</i> .....	121
3.3.1	Humane IEC .....	121
3.3.2	Humane monozytäre Zellen.....	125

3.4	Tlr2-abhängige P-gp-Expression in murinen myeloischen Zellen.....	139
3.5	Mdr1a-Abhängigkeit bei MTX-induzierter intestinaler Mukositis .....	140
3.5.1	Histopathologie und Zytotoxizität bei Mdr1a-Defizienz .....	140
3.5.2	Wirkung von <i>E. coli</i> auf TLR2/MDR1A dKO-Cd11b <sup>+</sup> -Zellen.....	142
3.6	Therapieansatz für MTX-induzierte Mukositis in Mäusen .....	146
3.6.1	Klinische und histopathologische Parameter .....	146
3.6.2	Inflammatorische Genotoxizität.....	148
4	Diskussion.....	151
5	Zusammenfassung und Ausblick .....	165
	Summary and future perspective .....	167
6	Anhang.....	168
6.1	Monozyten-/Makrophagenmarker in THP-1-Zellen.....	168
6.2	Auflistung der MTX-regulierten Gene .....	168
6.3	MTX-regulierte Gene des xenobiotischen Metabolismus .....	177
7	Literaturverzeichnis .....	183
	Internetquellen.....	198
	Danksagung .....	199
	Lebenslauf .....	200
	Erklärung .....	201

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Fünf-Phasen-Modell der Mukositis-Pathogenese, entnommen aus [181].	20
Abb. 1.2: Schematische Darstellung des mukosalen Immunsystems des Dünndarms, entnommen aus [146].	23
Abb. 1.3: PCSK-Bindungsstelle an den TLR1/TLR2-Heterodimer, entnommen aus [13].	27
Abb. 1.4: Modell des Substrattransportes durch P-GP, entnommen aus [1].	34
Abb. 1.5: Übersicht der funktionellen Expression des P-GP-Transporters, entnommen aus [12].	36
Abb. 1.6: Schematischer Aufbau des ABCB1/MDR1-Promotors, entnommen aus [78, 96, 170] und modifiziert.	37
Abb. 1.7: Schematische Darstellung der einzelnen SNP, entnommen aus [2].	41
Abb. 2.1: Übersicht der Darmabschnitte einer Maus.	72
Abb. 2.2: Aufbau der <i>X-cell II™ Blot-Module-Blotting</i> -Apparatur.	89
Abb. 3.1: Genotypisierung von unterschiedlichen Mausstämmen mit PCR.	99
Abb. 3.2: Effekt der MTX-Gabe auf das Körpergewicht an Tag 7.	101
Abb. 3.3: Histopathologie des proximalen Jejunums nach MTX-Gabe.	102
Abb. 3.4: Histopathologie des terminalen Ileums nach MTX-Gabe.	103
Abb. 3.5: Histopathologie des Colons nach MTX-Gabe.	104
Abb. 3.6: Quantifizierung der histopathologischen Daten nach MTX-Gabe.	105
Abb. 3.7: Histopathologie der Zunge nach MTX-Gabe.	106
Abb. 3.8: Der oxidative Stress nach MTX-Gabe im proximalen Jejunum.	107
Abb. 3.9: Immunfluoreszenzfärbung des proximalen Jejunums nach MTX-Gabe.	109
Abb. 3.10: Bakterienanalyse des Stuhls aus dem proximalen Jejunum nach MTX-Gabe.	110
Abb. 3.11: Genexpressionsprofil mittels <i>Microarray</i> -Analyse des proximalen Jejunums nach MTX-Gabe.	112



---

Abb. 3.12: Bestätigung ausgewählter Gene des entzündlichen Gewebeschadens, der angeborenen und erworbenen Immunität und des intestinalen Epithels mittels qRT-PCR nach MTX-Gabe im proximalen Jejunum. ....	114
Abb. 3.13: Bestätigung ausgewählter Gene von Transportern und assoziierten Transkriptionsfaktoren mittels qRT-PCR nach MTX-Gabe im proximalen Jejunum.....	118
Abb. 3.14: Immunfluoreszenzfärbung von P-gp im proximalen Jejunum nach MTX-Gabe. ....	120
Abb. 3.15: MDR-Efflux-Aktivität nach TLR2-Stimulation in IEC. ....	122
Abb. 3.16: Metabolische Aktivität nach TLR2-Stimulation und MTX-Gabe in IEC. .	123
Abb. 3.17: Auswirkungen der TLR2-Stimulation und MTX-Gabe auf die mRNA-Genexpression von Becherzellfaktoren in IEC. ....	124
Abb. 3.18: Zeitverlauf der ABCB1-mRNA-Expression nach PCSK-Stimulation in THP-1-Zellen. ....	126
Abb. 3.19: Zeitverlauf der P-GP-Proteinexpression nach PCSK-Stimulation in THP-1-Zellen. ....	127
Abb. 3.20: MDR-Efflux-Aktivität nach TLR2-Stimulation in THP-1-Zellen.....	128
Abb. 3.21: P-GP-abhängiger Efflux von FL-MTX nach TLR2-Stimulation in THP-1-Zellen. ....	129
Abb. 3.22: Proteinexpression von P-GP nach TLR2-Stimulation und MTX-Gabe in THP-1-Zellen.....	130
Abb. 3.23: Nachweis der TLR2-Signalweg-Aktivierung mittels SEAP-Assay nach PCSK- und MTX-Gabe in THP-1-Zellen. ....	131
Abb. 3.24: Metabolische Aktivität nach TLR2-Stimulation und MTX-Gabe in THP-1-Zellen. ....	132
Abb. 3.25: Metabolische Aktivität nach TLR4-Stimulation und MTX-Gabe in THP-1-Zellen. ....	133
Abb. 3.26: Funktionelle Auswirkungen der TLR2-Stimulation auf MTX-induzierte Zytotoxizität in THP-1-Zellen.....	134

---

Abb. 3.27: mRNA-Genexpression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen nach TLR2-Stimulation und MTX-Gabe in THP-1-Zellen.....	135
Abb. 3.28: Proteinexpression von Cleaved-PARP nach TLR2-Stimulation und MTX-Gabe in THP-1-Zellen. ....	137
Abb. 3.29: Zeitabhängige Aktivierung des P38-MAPK-Signalweges nach TLR2-Stimulation in THP-1-Zellen. ....	137
Abb. 3.30: Modulation des P38-MAPK-Signalweges nach TLR2-Stimulation und MTX-Gabe in THP-1-Zellen. ....	138
Abb. 3.31: TLR2-abhängige Proteininduktion des Transporters P-gp trotz MTX-Gabe in murinen CD11b <sup>+</sup> -Zellen.....	139
Abb. 3.32: Mdr1a-Abhängigkeit des Tlr2-vermittelten protektiven Effektes auf MTX-induzierte intestinale Mukositis im proximalen Jejunum.....	141
Abb. 3.33: <i>E. coli</i> -induzierter Zelltod in Cd11b <sup>+</sup> -TLR2/MDR1A dKO-myeloischen Zellen.....	143
Abb. 3.34: Ausmaß der <i>E. coli</i> -induzierten Apoptose via Casp1 in TLR2/MDR1A dKO-myeloischen Zellen.....	144
Abb. 3.35: Ausmaß der Chemotoxizität im proximalen Jejunum nach Depletion der Mikrobiota und Gabe von PCSK <i>in-vivo</i> . ....	147
Abb. 3.36: Protektiver Effekt der oralen Therapie mit PCSK in Mikrobiota-depletierten WT-Mäusen nach MTX-Gabe. ....	149
Abb. 6.1: Durchflusszytometrische Analyse von THP-1-Zellen auf die Expression verschiedener Monozyten-/Makrophagenmarker.....	168

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Topologie einiger wichtiger ABC-Transporter, entnommen aus [68] und modifiziert. ....	32
Tabelle 1.2: P-GP-Substrate aus verschiedenen Arzneistoffklassen.....	33
Tabelle 1.3: P-GP-Substrate aus der Arzneistoffklasse Chemotherapeutika. ....	33
Tabelle 1.4: P-GP-Inhibitoren. ....	35
Tabelle 2.1: Pipettierschema der Tlr2- und Md-2-Genotypisierungs-PCR.....	69
Tabelle 2.2: PCR-Programm für die Tlr2- und Md-2-Genotypisierungs-PCR. ....	70
Tabelle 2.3: Übersicht der einzelnen Organstücke und ihre Lagerung. ....	73
Tabelle 2.4: Kriterien des Histologie-Scores.....	78
Tabelle 2.5: Anwendung des Primärantikörpers bei indirekter Immunfluoreszenz- Färbung. ....	80
Tabelle 2.6: Blockierungspuffer und Verdünnung der Primärantikörper. ....	90
Tabelle 6.1: MTX-regulierte Gene im proximalen Jejunum.....	168
Tabelle 6.2: MTX-regulierte Gene im proximalen Jejunum von behandelten TLR2 KO-Mäusen im Vergleich zu behandelten WT-Mäusen. ....	177
Tabelle 6.3: Identifizierung des kanonischen Signalweges der 140 identifizierten MTX-regulierten Gene im proximalen Jejunum von WT- und TLR2 KO- Mäusen.....	182

**Abkürzungsverzeichnis**

5-FU	5-Fluorouracil
AB/AM	Antibiotisch/Antimykotisch
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
ABCA	<i>ABC Subfamily A Member</i>
ABCB	<i>ABC Subfamily B Member</i> = MDR
ABCC	<i>ABC Subfamily C Member</i> = MRP
ABCG	<i>ABC Subfamily G Member</i>
Abx	Antibiotika
AIEC	<i>adhärent-invasive E. coli</i>
AKT	<i>V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog</i>
ALPI	Alkalische Phosphatase, intestinal
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
APC	Allophycocyanin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCL-3	<i>B-Cell CLL/Lymphoma-3</i>
BCP	1-Bromo-3-Chloropropan
BCRP1	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i> = ABCG2
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CAR	<i>Constitutive Androstane Receptor</i> = NR1I3
CASP1	Caspase-1
CBL-B	<i>Cbl Proto-Oncogene B, E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>
CBP	<i>CREB-Binding Protein</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer-Binding Protein</i>
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CLD	<i>Chloride Anion Exchanger</i> = SLC26A3
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2

---

CREB	<i>cAMP Responsive Element-Binding Protein</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CU	Colitis Ulcerosa
CX43	Connexin 43
CYLD	<i>Cylindromatosis</i>
CYP450	Cytochrome P450
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> (Schäden-assozierte molekulare Strukturen)
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DES	DNase/Pyrogen-freies Wasser
DiOC <sub>2</sub> (3)	<i>3,3-Diethyloxacarbocyanine</i>
dKO	Doppel-Knockout
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle-Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSS	Dextran Sodium Sulfat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescent</i> (Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	Grün-fluoreszierendes Protein
EGR1	<i>Early Growth Response 1</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent-Assay</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential-Medium</i>
ERK	<i>Extracellular-Signal Regulated Kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fötales Kälberserum)
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL-MTX	fluoreszierendes MTX
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)

---

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
<i>H.</i>	<i>Helicobacter</i>
HAT	Histon-Acetylase
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylase
H/E	Hämatoxylin/Eosin
HIF-1	<i>Hypoxia-Inducible Factor-1</i>
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HRP	<i>Horseradish-peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HSE	<i>Heat-Shock-Element</i>
HSF	<i>Heat-Shock-Faktor</i>
IEC	Intestinale Epithelzellen
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IKK	<i>Inhibitor of Nuclear Factor kappa-B</i>
IL	Interleukin
IL1R1	IL1 Rezeptor
IL1RL1	IL1 Rezeptor-Like
iMED	<i>inverse Multiple Start Site Element Downstream</i>
INR	Initiator-Element
<i>i.p.</i>	<i>intraperitoneal</i>
IPA	<i>Ingenuity®-Pathway-Analyse</i>
IRAK	IL1 Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF3	<i>IFN-Regulatory Factor 3</i>
JNK	<i>c-Jun N-Terminal Kinase</i>
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
KO	Knockout
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LBP	<i>LPS-Binding Protein</i>
LCN2	Lipocalin 2
LDH	Laktatdehydrogenase

---

LEF	<i>Lymphoid Enhancer Factor</i>
LGG	<i>L. rhamnosus</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine Rich Repeats</i> (Leucin-reiche Wiederholungen)
LY6G	<i>Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus G</i>
LYZ2	Lysozym 2
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MASCC/ISOO	<i>Multinational Association of Supportive Care in Cancer and International Society of Oral Oncology</i>
MD-2	<i>Myeloid Differentiation Protein-2</i>
MDR	<i>Multidrug Resistance Gene</i> = ABCB
MEF1	<i>MDR1 Promotor-Enhancing Factor 1</i>
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MKK	MAPK-Kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP	<i>Multidrug Resistance-Like Protein</i> = ABCC
MSD	<i>Membrane-Spanning Domain</i> (Transmembran-Domäne)
MTS	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2(Sulfophenyl-2H-Tetrazolium)
MTX	Methotrexat
MUC2	Mucin 2
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88</i>
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NBD	<i>Nucleotide-Binding Domain</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>

---

NF-Y	<i>Nuclear Transcription Factor-Y</i>
NGS	<i>Normal Goat Serum</i> (Normales Ziegenserum)
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NLRP6	<i>NLR Family, Pyrin Domain Containing 6</i>
NR0B2	<i>Nuclear Receptor Subfamily 0, Group B, Member 2</i>
NR1I2	<i>Nuclear Receptor Subfamily 1, Group I, Member 2</i> = PXR
NR1I3	<i>Nuclear Receptor Subfamily 1, Group I, Member 3</i> = CAR
ODN	CpG-Oligodeoxynukleotid
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i> (operative taxonomische Einheit)
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> (Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen)
PARP	Poly (ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PCSK	Pam <sub>3</sub> Cys-SK <sub>4</sub> x 3HCl
PE	Phycoerythrin
PES	Phenazin-Ethosulfat
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin-E Rezeptor 2
P-GP	P-Glycoprotein
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>p.o.</i>	<i>per os</i>
PPAR <sub>γ</sub>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PS	Penizillin/Streptomycin
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid



---

PXR	<i>Pregnan-X-Receptor</i> = NR1I2
qRT-PCR	Quantitative <i>Realtime</i> Reverse-Transkriptions-PCR
RAF	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
RMA	<i>Robust Multichip Average</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
S.	<i>Salmonella</i>
SARM	<i>Sterile Alpha and TIR Motif Containing</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEAP	<i>Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase</i> (embryonale alkalische Phosphatase)
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
SI	Sucrase-Isomaltase
SIGIRR	<i>Single Immunoglobulin IL1R-Related Molecule</i>
SLC26A3	<i>Solute Carrier Family 26 (Anion-Exchanger), Member 3</i> = CLD
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SOCS1	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 1</i>
SP	<i>SP Transcription Factor</i>
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i> (Spezifiziert Pathogen-frei)
SSC	<i>Side Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TAB	<i>TAK1-Binding Protein</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TAG	<i>Temporal <math>\alpha</math>-Galactosidase</i>
TAK1	<i>TGF-<math>\beta</math>-Activated Kinase 1</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TCF	<i>T-Cell Factor</i>
TFF3	<i>Trefoil Factor 3</i>

TIMP1	<i>Tissue Metallopeptidase Inhibitor 1</i>
TIR	Toll-IL1 Rezeptor
TJP1	<i>Tight-Junction-Protein 1</i> = ZO-1
TLR	Toll-Like Rezeptor
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TOLLIP	Toll- <i>Interacting</i> -Protein
TRAF6	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 6</i>
TRIF	<i>TIR Domain Containing Adaptor Protein Inducing Interferon-<math>\beta</math></i>
TRIM	<i>Tripartite Motif Containing</i>
TUNEL	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling</i>
UV	Ultraviolett
VIL1	Villin 1
WST	<i>Water Soluble Tetrazolium</i>
WT	Wildtyp
ZO-1	<i>Zonula Occludens 1</i> = TJP1
ZTL	Zentrales Tierlaboratorium

# 1 Einleitung

## 1.1 Chemotherapie-induzierte intestinale Mukositis

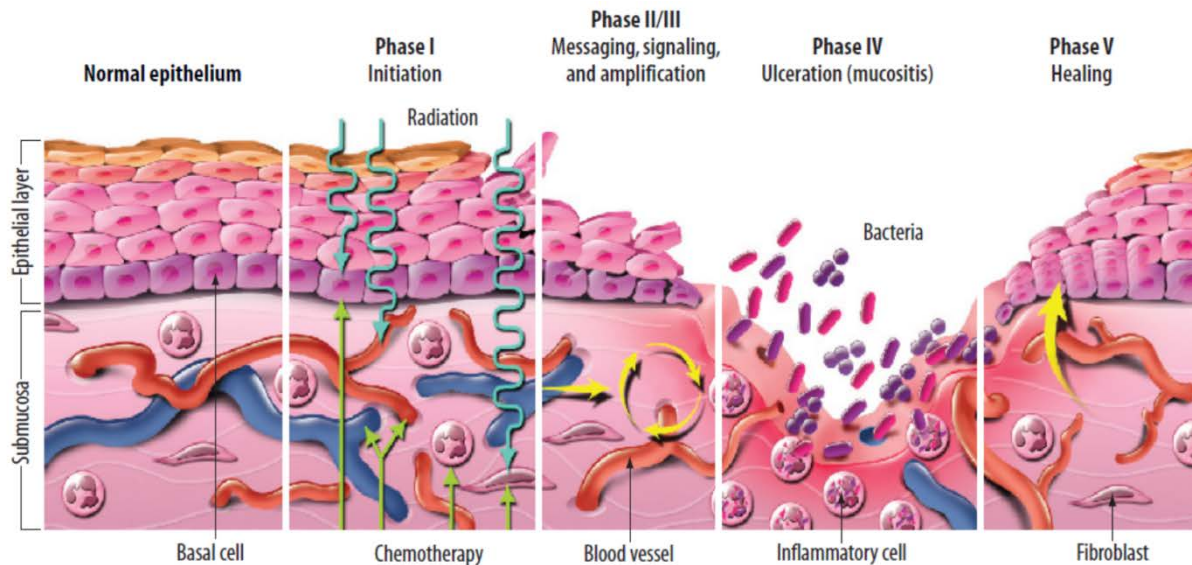
Chemotherapien lösen schwerwiegende Nebenwirkungen aus, wie z.B. Myelosuppression [179] oder *Steatosis Hepatis* [171]. Die am häufigsten auftretende Nebenwirkung ist die Mukositis des Gastrointestinaltraktes [204], welche zu verringerter Lebensqualität und erhöhter Morbidität der Krebs-Patienten führt [179]. Symptome der intestinalen Mukositis nach Krebs-Behandlungen sind Diarrhö, abdominale Schmerzen, Blutungen sowie Kachexie und Infektionen [181, 204]. Ein negativer ökonomischer Aspekt der Chemotherapie-vermittelten Entzündungen ist der Anstieg von Behandlungskosten, z.B. aufgrund eines verlängerten Krankenhausaufenthaltes [179].

Die Chemotherapie-induzierte intestinale Mukositis stellt eine dosislimitierende Toxizität dar und reduziert so den Therapieerfolg. Eine konventionelle Chemotherapie verursacht bei durchschnittlich 20 bis 40% der Patienten eine Mukositis [97], während bei einer Hochdosis-Chemotherapie bis zu 100% der Patienten unter intestinaler Mukositis leiden können [159]. Weitere Faktoren, welche den Schweregrad der Mukositis beeinflussen könnten, sind das Alter, das Geschlecht und der Körpermasseindex wie auch die Mundhygiene der Patienten [153, 176, 179].

### 1.1.1 Fünf-Phasen-Modell

Die Pathogenese der Chemotherapie-induzierten intestinalen Mukositis ist nicht vollkommen geklärt. Die Entwicklung der gastrointestinalen Entzündung ist von Sonis als ein dynamischer Fünf-Phasen-Prozess beschrieben worden: 1. Initiation, 2. primäre Antwort auf Schäden, 3. Signalamplifikation, 4. Ulzeration und 5. Wundheilung [180].

In der Initiations-Phase führen Chemotherapeutika bzw. Bestrahlungen zur vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezien (ROS), welche Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schäden der Epithelzellen auslösen [180, 182] (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Fünf-Phasen-Modell der Mukositis-Pathogenese, entnommen aus [181].**

Chemotherapien (*Chemotherapy*) und Bestrahlungen (*Radiation*) führen zur vermehrten ROS-Produktion (Phase I) [182]. ROS induzieren DNA-Schäden, worauf Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B, aktiviert werden (Phase II). Die pro-inflammatorischen Mediatoren IL1 $\beta$ , IL6 und TNF $\alpha$  werden anschließend erhöht sekretiert, wodurch Gewebeschäden und Apoptose getriggert werden [180, 182]. Der Chemotherapie- bzw. Bestrahlung-induzierte Fibronectin-Abbau führt zur Makrophagen-Rekrutierung, welche die Aktivierung von MMP und die Produktion von TNF $\alpha$  verstärkt [182]. Die Signale der bisherigen Prozesse werden vor allem durch TNF $\alpha$  amplifiziert (Phase III). Die darauffolgende Beeinträchtigung der mukosalen Barriereintegrität ermöglicht eine Bakterientranslokation, wodurch Makrophagen in der Lamina Propria aktiviert werden und die Mukositis verschlimmert wird (Phase IV) [180, 182]. Letztlich löst die extrazelluläre Matrix Wundheilungs-Signale aus, welche zu epithelialer Zellmigration, -proliferation und -differenzierung führen (Phase V) [180].

Als primäre Antwort auf die DNA-Schäden werden verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa B*), aktiviert [180]. In der Folge werden pro-inflammatorische Zytokine, wie Interleukin (IL) 1 $\beta$ , IL6 und TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), induziert, durch welche Gewebeschäden und Apoptose weiter exazerbieren [180, 182]. Darüber hinaus wird während der Mukositis Fibronectin abgebaut [182]. Hierdurch werden Makrophagen rekrutiert, welche Matrix-Metalloproteinasen (MMP) stimulieren und die TNF $\alpha$ -Produktion steigern. In der Phase der Signalamplifikation führt so unter anderem TNF $\alpha$  zu einer Signalverstärkung der bisherigen Prozesse [182]. Hierbei aktiviert TNF $\alpha$  vor allem den Ceramid-Signalweg, wodurch die Apoptose zusätzlich verstärkt wird [180, 182].

Während der Ulcerations-Phase kommt es zum Verlust der mukosalen Barriereintegrität, welche eine kommensale Translokation ermöglicht [180]. Bakterielle Antigene aktivieren unter anderem Makrophagen der Lamina Propria, welche wiederum die pro-inflammatorischen Mediatoren IL1 $\beta$ , IL6 und TNF $\alpha$

vermehrt ausschütten [182]. Dies führt zu einer dramatischen Progression der Entzündung. In der Phase der Heilung löst schließlich die extrazelluläre Matrix Signale aus, die eine beschleunigte epitheliale Zellmigration, -proliferation und -differenzierung induzieren [180].

### **1.1.2 Unzureichende Therapieansätze**

Aufgrund der Nebenwirkungen muss die Dosis von Chemotherapeutika, wie beispielsweise von Methotrexat (MTX), oftmals verringert werden, um das Fortschreiten der Mukositis einzuschränken [204]. Hierdurch kann der Therapie-Erfolg der Krebsbehandlung beeinträchtigt werden [204].

Bisher gibt es aber keine erfolgreichen Prophylaxen oder Therapien gegen die Chemotherapie-induzierte intestinale Mukositis bei der Behandlung von verschiedenen Karzinomen, ohne dass die Dosis der Zytostatika verringert werden muss [180]. Die derzeitigen Leitlinien des klinischen Einsatzes bei Mukositis sind von der MASCC/ISOO (*Multinational Association of Supportive Care in Cancer and International Society of Oral Oncology*) festgelegt worden [97]. Die Gabe von Amifostin, Octreotid und Probiotika wird zur Behandlung der Chemotherapie-induzierten Mukositis empfohlen, wobei jeweils der Evidenzgrad eingeschränkt ist.

Zukünftig müssen wirksame Therapien entwickelt werden, um die Progression der Chemotherapie-induzierten Mukositis bei der Behandlung aller Krebsarten zu hemmen. Hierbei ist es essentiell, die Pathogenese im Detail zu klären.

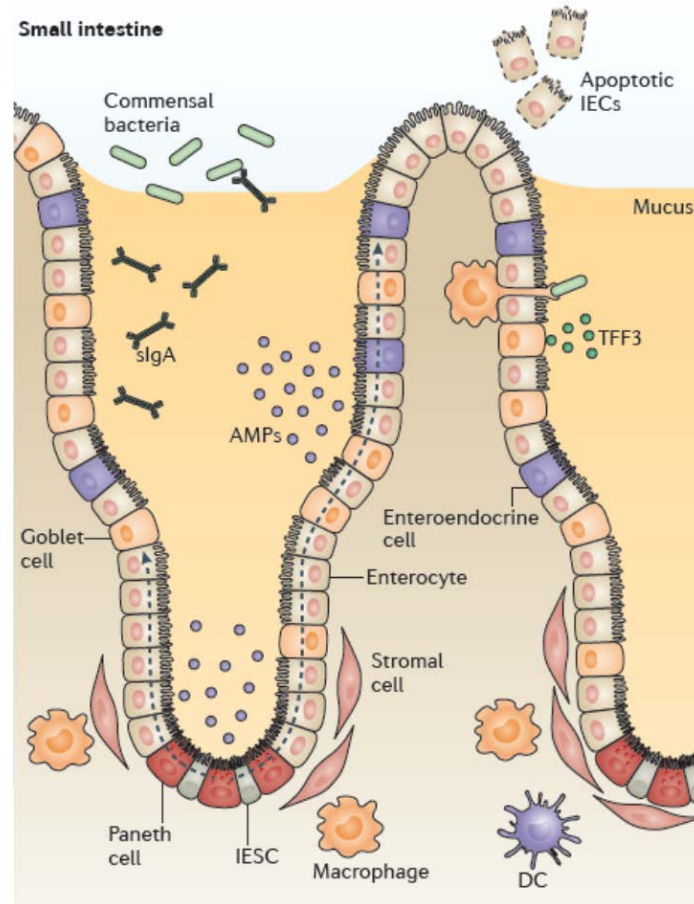
## **1.2 Mukosales Immunsystem**

Der Gastrointestinaltrakt ist konstant von potenziellen „Feinden“ umgeben. Ein beständiges homöostatisches Gleichgewicht zwischen einerseits Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen der Nahrung sowie der normalen Mikrobiota und andererseits einer Immunabwehr gegenüber Fremdstoffen und pathogenen Antigenen ist für die Regulation des mukosalen Immunsystems essentiell [82].

Die Dünndarm-Schleimhaut resorbiert unter anderem Vitamine, Fette, Kohlenhydrate und Eiweiße, aber auch Medikamente. Das einschichtige intestinale Epithel und die darunterliegende Lamina Propria dienen als physische und immunologische Barriere des mukosalen Immunsystems gegenüber sogenannten Pathogen- und Schädens-assoziierten molekularen Strukturen (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP) bzw. *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMP)). In der Lamina Propria, einer lockeren Bindegewebsschicht, befinden sich Immunzellen, wie Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten sowie dendritische Zellen [109]. Für den Barrierschutz müssen eigene (*self*) und fremde (*non-self*) Bestandteile schnell und präzise mit Hilfe von *Pattern Recognition Receptors* (PRR) unterschieden werden [123]. PAMP sind beispielsweise Lipide, Lipoproteine und Nukleinsäuren, die aus Viren, Bakterien, Parasiten und Pilzen stammen können [87]. DAMP umfassen intrazelluläre Proteine, die von myeloischen, lymphoiden und parenchymalen Zellen sekretiert werden, wie z.B. *Heat-Shock*-Proteine [108]. Umweltbedingte wie auch genetische Faktoren können PRR-Funktionen deregulieren, welche zu Veränderungen der kommensalen Komposition und zu Entzündungsreaktionen im Darm führen können [209].

Die typischen anatomischen Merkmale des Dünndarms sind die sogenannten Villi und Lieberkühn'schen Krypten (Abb. 1.2). Die Krypten enthalten Paneth'sche Körnerzellen, welche anti-mikrobiell-wirkende Defensine und Lysozyme sekretieren [125]. Weiterhin befinden sich in den Krypten unreife bzw. undifferenzierte Stammzellen, welche sich zu Becherzellen, Enterozyten, enteroendokrine Zellen, Paneth'sche Körnerzellen oder M-Zellen ausdifferenzieren. Die Regeneration der intestinalen Epithelschicht dauert durchschnittlich 24 bis 96h [150].

Die Villi bestehen primär aus resorbierenden Enterozyten, welche am apikalen Pol einen Mikrovilli-Saum tragen. Dieser sogenannte Bürstensaum dient der Oberflächenvergrößerung zur Resorption von Nährstoffen. Für die Abwehr von körperfremden Substanzen sowie für die Endverdauung verschiedener kleiner Nährstoffmoleküle ist der Bürstensaum mit einer Schicht aus Glycoproteinen bedeckt [115].



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung des mukosalen Immunsystems des Dünndarms, entnommen aus [146].**

Das einschichtige Epithel, welches als erste physische und immunologische Barriere des mukosalen Immunsystems agiert, besteht aus ausdifferenzierten Epithelzellen (Becherzellen (*Goblet cell*), Enterozyten (*Enterocyte*), enteroendokrine Zellen (*Enteroendocrine cell*), Paneth'sche Körnerzellen (*Paneth cell*) und M-Zellen).

Die ebenfalls in den Villi vorkommenden Becherzellen sekretieren Muzine oder antimikrobielle Peptide ab, wodurch eine schützende Mukusschicht entsteht [146]. Die Mukusschicht ermöglicht es, die Invasion von kommensalen und schädlichen Bakterien zu hemmen [146]. Weiterhin kommen in den Villi und Krypten enteroendokrine Zellen vor. Das Darmepithel besteht darüber hinaus aus den spezialisierten M-Zellen, die auf ihrer apikalen Seite Antigene über Endozytose aufnehmen und in die darunter liegenden Peyer'sche Plaques weiterleiten. Die durch Antigene induzierte Aktivierung von B- und T-Zellsubtypen in den Peyer'schen Plaques führt zur erworbenen Immunantwort. Intraepitheliale Lymphozyten, die zwischen IEC lokalisiert sind, regulieren über die Sekretion von Zytokinen die epitheliale Barrierefunktion mit.

Monozyten/Makrophagen, die sich in der Mukosa des gesamten Gastrointestinaltraktes befinden, sind vor allem in der Lamina Propria lokalisiert [4]. Als Effektorzellen sind Monozyten/Makrophagen bei der Erkennung und Eliminierung von Pathogenen wie auch von apoptotischen Zellen mittels verschiedener Rezeptoren beteiligt [4, 84, 142]. Toll-*Like* Rezeptoren (TLR), Lektine, Komplement- und Fc $\gamma$ -Rezeptoren sowie sogenannte *Scavenger* Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Phagozytose [84]. Darüber hinaus sind TLR bei der Induktion der gezielten Immunantwort involviert (Kapitel 1.3). Im gesunden Zustand zirkulieren Monozyten bis zu drei Tage in der Blutlaufbahn [191]. Bei intestinalen Entzündungen und Infektionen werden Monozyten vermehrt zur peripheren Darmschleimhaut rekrutiert, wo sich die Monozyten zu Makrophagen differenzieren [177]. Dort setzen die Makrophagen pro-inflammatorische Zytokine, wie z.B. IL1, IL6 oder TNF $\alpha$ , frei, wodurch weitere Monozyten/Makrophagen mobilisiert werden [84]. Zusätzlich werden anti-inflammatorische Mediatoren, wie IL10 oder PGE2 (Prostaglandin-E Rezeptor 2), induziert [142]. Hierbei präsentieren die Monozyten/Makrophagen den T-Zellen die aufgenommenen Antigene [84], wodurch die erworbene Immunantwort initiiert wird.

### 1.3 Toll-*Like* Rezeptoren (TLR)

TLR, eine Gruppe von PRR, besitzen eine Schlüsselfunktion bei der Induktion von pro- und anti-inflammatorischen Genen und wirken bei der Kontrolle der erworbenen Immunantwort mit [20, 121]. Weiterhin werden TLR mit der Regulation der Zellproliferation und des Zellüberlebens assoziiert [20]. TLR werden in verschiedenen Zelltypen, wie z.B. Monozyten, Makrophagen, IEC oder dendritischen Zellen, entweder konstitutiv oder induzierbar exprimiert [20]. In Säugetieren wurden bisher 13 unterschiedliche TLR beschrieben (10 in Menschen; 13 in Mäusen) [175]. TLR sind Typ I-Transmembranproteine, die sich aus drei Domänen zusammensetzen: einer extrazellulären Domäne mit Leucin-reichen Wiederholungen (*Leucine Rich Repeats*; LRR) für die Ligandenbindung, einer kurzen Transmembran-Domäne und einer hochkonservierten intrazellulären Toll-IL1-Rezeptor (TIR)-Domäne, die für die Signalweiterleitung entscheidend ist [20, 87, 155].



Die verschiedenen TLR unterscheiden sich in ihrer Lokalisation: TLR1, TLR2, TLR5, TLR6 und TLR11 sind an der Zelloberfläche lokalisiert. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 werden in intrazellulären Vesikeln exprimiert [56, 87]. TLR4 kann an der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Vesikeln exprimiert sein. Spezifische Liganden binden an die unterschiedlichen TLR und leiten so eine individuelle Immunantwort ein.

### 1.3.1 Signaltransduktion

Adaptermoleküle werden nach der Ligandenbindung an die TLR rekrutiert und binden mit ihrer TIR-Domäne an die TLR. Das Adaptermolekül MyD88 (*Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*) [122] wird von allen TLR, außer TLR3, erkannt [155], während TLR3 und TLR4 an TRIF (*TIR Domain Containing Adaptor Protein Inducing Interferon- $\beta$* ) binden [222].

Der MyD88-abhängige Signalweg aktiviert IL1 Rezeptor-assoziierte Kinasen (IRAK1, IRAK2, IRAK4 und IRAKM) [93, 195]. Anschließend wird die E3-Ubiquitinligase TRAF6 (*Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 6*) induziert [16] und darauffolgend die Ubiquitinierung von TAB2 (*TGF- $\beta$ -Activated Kinase 1 (TAK1)-Binding Protein 2*) und TAB3 initiiert [83]. Dies führt zur Aktivierung von TAK1 [26], wodurch der IKK (*Inhibitor of Nuclear Factor kappa-B*)-Komplex durch Phosphorylierung von IKK $\beta$  induziert wird [210]. Somit kommt es zur Phosphorylierung und Degradierung vom NF- $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B [26]. Anschließend transloziert NF- $\kappa$ B in den Nukleus und induziert die Transkription der Zielgene.

TAK1 phosphoryliert zusätzlich mehrere MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) [210]. MKK3 (MAPK-Kinase 3)-MAPK und MKK6-MAPK vermitteln die Phosphorylierung von P38-MAPK, welche wiederum den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP Responsive Element-Binding Protein*) induziert. Zugleich wird durch die Phosphorylierung der MAPK ERK1 (*Extracellular-Signal Regulated Kinase 1*), ERK2 und JNK (*c-Jun N-Terminal Kinase*) die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (*Activator Protein-1*) initiiert.

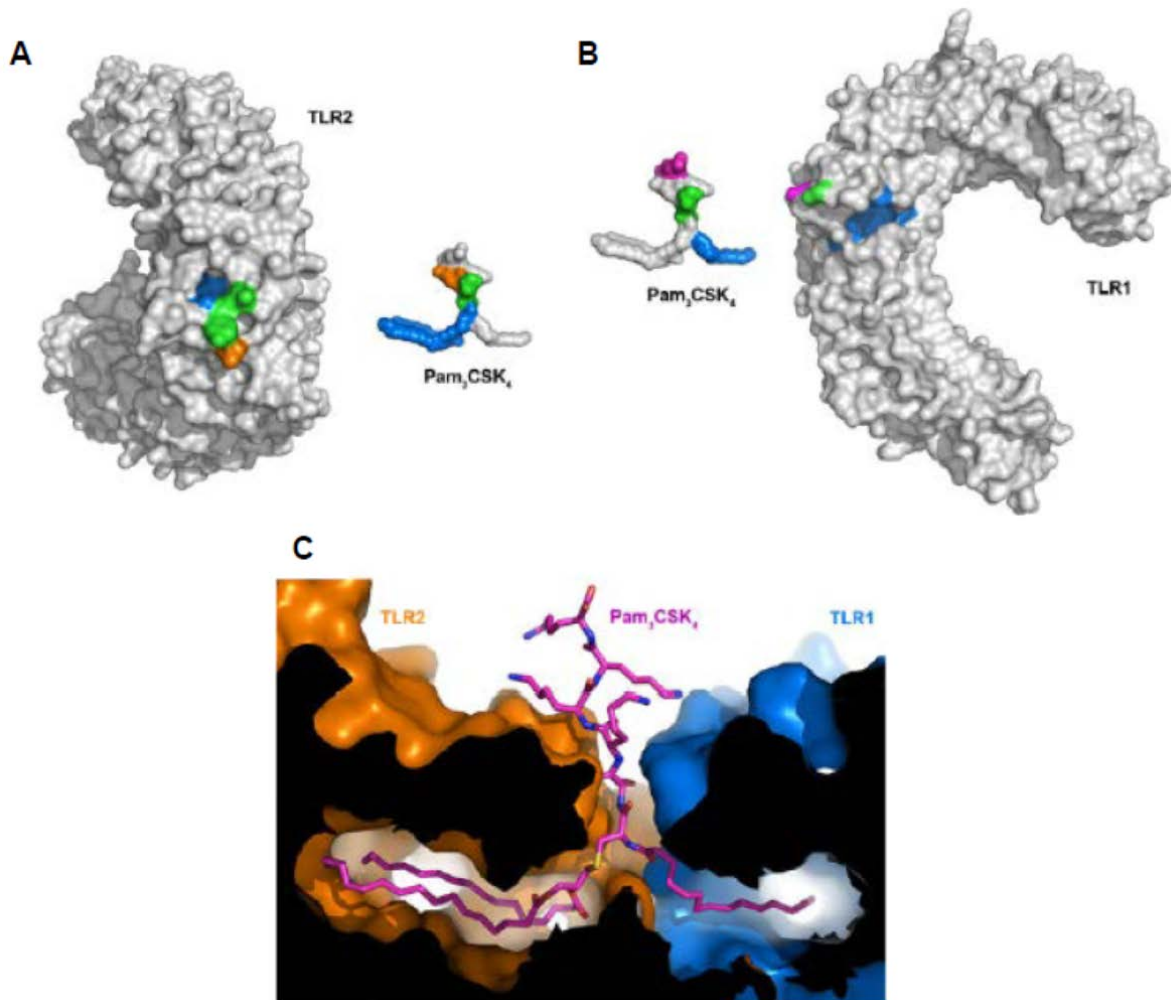
NF- $\kappa$ B wird im TRIF-abhängigen Signalweg ebenfalls über TRAF6 und TAK1 induziert [76]. Darüber hinaus wird hier IRF3 (*IFN-Regulatory Factor 3*) aktiviert und die nukleäre IRF3-Translokation vermittelt, durch die die Immunantwort durch die Expression von Typ I-IFN initiiert wird [88].

Wahrscheinlich ist die basale TLR-Expression im gesunden Darm in der Regel niedrig, um die Toleranz gegenüber den vielen angesiedelten Bakterien zu gewährleisten [18]. Um überschießende Immunantworten zu vermeiden, muss der TLR-Signalweg gehemmt werden. Für diese Negativ-Regulation sind eine Reduktion der Rezeptor-Expression, die Kompartimentierung der Rezeptor-Lokalisierung und das Unterbinden der Rezeptor-Signalkaskade notwendig [18]. Während der MyD88-abhängige Signalweg beispielsweise durch SOCS1 (*Suppressor of Cytokine Signaling 1*) oder CBL-B (*Cbl Proto-Oncogene B, E3 Ubiquitin Protein Ligase*) inhibiert wird, wird der TRIF-abhängige Signalweg unter anderem durch SARM (*Sterile Alpha and TIR Motif Containing*) oder TAG (*Temporal  $\alpha$ -Galactosidase*) supprimiert [88]. Hierbei wird die Bindung der TLR an MyD88 bzw. TRIF verhindert. TRAF6-Aktivierung wird unter anderem durch CYLD (*Cylindromatosis*), TRIM38 (*Tripartite Motif Containing 38*) und NR0B2 (*Nuclear Receptor Subfamily 0, Group B, Member 2*) [88] unterbunden, TAK1-Aktivierung durch TRIM30 $\alpha$  [173].

Weiterhin wird eine TLR-abhängige Immunantwort durch z.B. SIGIRR (*Single Immunoglobulin IL1R-Related Molecule*), welches den pro-inflammatorischen IL1R/TLR4-Signalweg blockiert, gehemmt [220]. Die selektive Induktion von transkriptionellen Repressoren, wie z.B. BCL-3 (*B-Cell CLL/Lymphoma-3*), limitiert via NF- $\kappa$ B ebenfalls die pro-inflammatorische TLR-Antwort [21]. Darüber hinaus unterbindet eine hohe TOLLIP (*Toll-Interacting-Protein*)-Expression die IRAK-Aktivierung [137]. PPAR $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$* ) und A20 führen zu einer Herunterregulation des pro-inflammatorischen NF- $\kappa$ B [89, 135].

TLR2, welches unter anderem in primären Monozyten bzw. THP-1-Zellen exprimiert wird [227], bindet zahlreiche PAMP [164, 193], wie z.B. bakterielle Lipopeptide, Peptidoglykane und Lipoteichonsäure aus gram-positiven Bakterien [87]. Diese Vielfältigkeit der TLR2-bindenden PAMP kann mit der Bildung der Heterodimeren TLR1/TLR2 und TLR2/TLR6 begründet werden [164, 193]. Das TLR2/TLR6-Heterodimer bindet an bakterielle Diacyl-Lipopeptide [164, 193]. Im Gegensatz dazu

erkennt das TLR1/TLR2-Heterodimer Triacyl-Lipopeptide [164, 193]. Der synthetisch hergestellte TLR2-Ligand PCSK (Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> x 3HCl) (Abb. 1.3) ist ein spezifischer Repräsentant für triacetylierte Lipopeptide [77].



**Abb. 1.3: PCSK-Bindungsstelle an den TLR1/TLR2-Heterodimer, entnommen aus [13].**

Der TLR1/TLR2-Heterodimer und PCSK interagieren miteinander, indem die beiden Ester-bindenden Palmitoyl-Gruppen des PCSK an (A, C) TLR2 und die Amid-bindende Palmitoyl-Kette an (B, C) TLR1 binden. Weiterhin bilden TLR1 und TLR2 Wasserstoffbrückenbindungen mit der Glycerol- und Peptidgruppe des PCSK und ermöglichen eine Bindung zum Schwefelatom.

Die bakterielle Zellwandkomponente Lipopolysaccharid (LPS) ist der spezifische Ligand von TLR4 [41]. Für die Bindung an LPS braucht TLR4 LBP (*LPS-Binding Protein*), CD14 (*Cluster of Differentiation 14*) und MD-2 (*Myeloid Differentiation Protein-2*), wobei LBP sich zuerst an LPS anlagert. Anschließend bindet dieser LBP-LPS-Komplex an den CD14-Rezeptor [87], welches zur Aktivierung von TLR4 führt.

### 1.3.2 Physiologische Funktion

Die TLR-Funktionen im Gastrointestinaltrakt sind kontextabhängig. Zelltypabhängig können verschiedene TLR sowohl protektive als auch destruktive Immunantworten auslösen. Der TLR-Signalweg schützt z.B. im basalen Zustand über verschiedene Regulationsmechanismen die intestinale, epitheliale Homöostase. Es wurde gezeigt, dass TLR2 unter anderem die *Tight-Junction*-assoziierte intestinale, epitheliale Barriereintegrität via PKC (Protein Kinase C)  $\alpha/\beta$  vor Stress-induziertem Schaden schützt [17]. Weiterhin ist TLR2 wahrscheinlich via PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase)/AKT (*V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog*)-Signalweg bzw. via TFF3 (*Trefoil Factor 3*) bei der Regulation des Zellüberlebens durch Inhibierung der Apoptose entscheidend [19, 151]. TLR4 hemmt zusätzlich via COX-2 (Cyclooxygenase-2) und PGE<sub>2</sub> die Apoptose im Gastrointestinaltrakt [53].

Eine unkontrollierte TLR-Aktivierung kann jedoch in der Darmschleimhaut destruktiv wirken [20]. So könnte ein dauerhaft aktivierter Zustand der TLR-vermittelten Immunantwort zu chronischen Immunerkrankungen führen. In primären IEC und in mononukleären Zellen der Lamina Propria von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) ist beispielsweise eine erhöhte TLR4-Expression detektiert [20]. Pro-inflammatorische Zytokine, wie IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ , können die mukosale TLR-Antwort sekundär verändern und so mukosale destruktive Immunreaktionen in colitischen TH1- und TH17-Zellen der Lamina Propria auslösen.

Fehlregulationen in den beschriebenen komplexen TLR-Signalmechanismen könnten Immunerkrankungen, wie CED, auslösen [20]. Eine TLR2-Defizienz führt z.B. zu einer verringerten Barriereintegrität, wodurch intestinale Entzündungen erhalten bleiben [44]. Genetische TLR-Mutationen sind wahrscheinlich bei der Pathogenese von Krankheiten von Bedeutung: Beispielsweise wird der TLR4-Einzelnukleotid-Polymorphismus (*Single Nucleotide Polymorphism*; SNP) D299G, der zu einer gesteigerten Induktion von pro-inflammatorischen und pro-karzinogenen Genen führt [45], mit einem erhöhten CED-Risiko in Verbindung gebracht [35].

Zusammengefasst sind TLR in der Darmschleimhaut bei der Abwehr gegenüber PAMP und bei der Wundheilung zellabhängig involviert, wodurch die mukosale und kommensale Homöostase im Darm aufrechterhalten wird.

## 1.4 Mikrobiom

Der humane Darm enthält im Vergleich zu der Gesamtzellzahl des menschlichen Körpers 10-fach mehr Bakterien [98]. Die Anzahl der Bakterien beträgt im adulten Dünndarm ungefähr  $10^2$  bis  $10^8$  Zellen pro Gramm des luminalen Inhaltes, im Dickdarm sind es  $10^{11}$  bis  $10^{12}$  Zellen [163]. Weiterhin ist das Mikrobiom 150-fach größer als das humane Genom [98]. Heutzutage wird durch verschiedene spezialisierte Hochdurchsatz-Sequenzierungen versucht, die genaue Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms aufzuschlüsseln [152]. Zu bedenken ist aber, dass jedes Individuum wahrscheinlich eine einzigartige Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota aufweist. Die Mikrobiota verwandter Personen zeigt jedoch eine höhere Ähnlichkeit zueinander als die von fremden Menschen [184].

Die Bakterienkolonisation erfolgt im ersten Lebensjahr und wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst [98]. Neben dem genetischen Aspekt sind die Immunität, die Umgebung und die Nahrung ausschlaggebend. Eine Hochfettdiät führt z.B. in wenigen Tagen zu einer akuten Modulation der Mikrobiota [33]. Die größte Wirkung auf die mikrobielle Komposition haben sicherlich Antibiotika (Abx). Bereits eine einzelne Abx-Behandlung verursacht Störungen in der Darm-Mikrobiota [98]. Die Wiederherstellung der mikrobiellen Diversität kann mehrere Monate dauern, wobei

sich die spätere Komposition signifikant von der ursprünglichen Mikrobiota-Zusammensetzung unterscheiden kann [98].

Weiterhin wurde gezeigt, dass Zytostatika die mikrobielle Zusammensetzung des Darmes verändern und die Translokation von gram-positiven Bakterien in die sekundären lymphatischen Organe induzieren [208]. Eine klinische Studie beschrieb, dass Chemotherapie-behandelte Patienten eine signifikante Reduktion einer Vielzahl an anaeroben Bakterien (z.B. *Bacteroides*, *Clostridium Cluster XIVa*, *Faecalibacterium prausnitzii* und *Bifidobacterium*) und *Streptococcus* spp. aufweisen [203]. Die Anzahl von *Enterococcus* spp. hingegen steigt drastisch an. Allerdings beobachtete eine andere Arbeitsgruppe eine Dezimierung der *Enterococcus* spp. bei Patienten nach Chemotherapie [188]. In beiden Studien wurde die Chemotherapie-induzierte Diarrhö mit der Veränderung der bakteriellen Komposition assoziiert [188, 203].

Die Mikrobiota-Zusammensetzung ist bei der protektiven mukosalen Immunität entscheidend [186]. Jegliche Störung der Mikrobiota beeinträchtigt die vorteilhafte Interaktion zwischen den Kommensalen und den Wirtszellen. Veränderungen in der kommensalen Zusammensetzung können den TLR-Signalweg (Kapitel 1.3) modulieren und so zu einem pro-inflammatorischen Phänotyp der Immunantwort führen [163]. CED-Patienten z.B. weisen eine veränderte Komposition der intestinalen Mikrobiota mit einer reduzierten bakteriellen Diversität, einer temporalen Instabilität und einer Depletion einiger Bakterienarten auf [51, 117]. So wird eine verringerte Anzahl vom anti-inflammatorischen *Faecalibacterium prausnitzii* [37] sowie von *Clostridium Cluster IV* und *XIVa* detektiert [51]. Weiterhin scheint ein Teil der CED-Patienten für fakultativ-pathogene Kommensalen, wie *adhärent-invasive Escherichia (E.) coli* (AIEC), prädisponiert zu sein [23].

## 1.5 ABC-Transporter P-Glycoprotein (P-GP)

Die Adenosintriphosphat (ATP)-*Binding Cassette* (ABC)-Proteinfamilie kommt in allen Lebewesen vor [162]. Die verschiedenen ABC-Proteine sind für den ATP-abhängigen Transport von Substanzen durch Lipidmembranen verantwortlich [103]. Die Hauptfunktion dieser Proteinfamilie besteht in der zellulären Elimination, der sogenannten Detoxifikation, von endogenen und exogenen Fremdstoffen, den sogenannten Xenobiotika [72, 103]. Hierbei spielen die ABC-Transporter eine wichtige Rolle beim Schutz des Organismus vor Akkumulation und Toxizität von Xenobiotika. Die verschiedenen, durch ABC-Transportergene kodierten Membranproteine werden aufgrund unterschiedlicher Funktionen [68] in sieben alphabetisch nummerierte Subfamilien, ABCA (*ABC Subfamily A Member*) bis ABCG (*ABC Subfamily G Member*), untergliedert. Die ABCB (*ABC Subfamily B Member*)/MDR (*Multidrug Resistance Gene*)- und ABCC (*ABC Subfamily C Member*)/MRP (*Multidrug Resistance-Like Protein*)-Transporter sind für den Medikamenten-Efflux verantwortlich, wodurch sie die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln mitkontrollieren [68].

Strukturell weisen die unterschiedlichen ABC-Transporter eine hohe Homologie auf [166]. In der Regel besteht ein aktiver ABC-Transporter aus zwei Transmembran-Domänen (*Membrane-Spanning Domain*; MSD), die sich jeweils aus sechs  $\alpha$ -Helices und einer *Nucleotide-Binding Domain* (NBD) zusammensetzen. Die hoch konservierten ATP-bindenden NBD [68] sind für die ABC-Proteinfamilie charakteristisch und ermöglichen durch die ATP-Bindung eine für den Efflux entscheidende Konformationsänderung der ABC-Transporter. Die vereinfachte Topologie einiger wesentlicher ABC-Transporter ist in Tabelle 1.1 aufgeführt.

**Tabelle 1.1: Topologie einiger wichtiger ABC-Transporter, entnommen aus [68] und modifiziert.**

ABCB1/MDR1	
ABCC1/MRP1	
ABCG2/BCRP1	

Der ABC-Transporter P-Glycoprotein (P-GP), welcher in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wird, ist der erste identifizierte und am meisten untersuchte ABC-Transporter im Gastrointestinaltrakt: 1976 wurde in Colchicin-resistenten CH<sup>R</sup>-Zellen eine Überexpression des P-gp beschrieben, welche mit einer Resistenz gegenüber amphiphilen Substanzen (das heißt gegenüber Substanzen, die in polaren und unpolaren Lösungsmitteln gut löslich sind) assoziiert wurde [79]. Im Menschen wird P-GP von ABCB1/MDR1 (UniProtKB-P08183) kodiert, in Mäusen von den beiden Isoformen Mdr1a (Synonym: Abcb1a; UniProtKB-P21447) und Mdr1b (Synonym: Abcb1b; UniProtKB-P067895). Das 170kDa große humane Protein, welches 29 Exons umfasst, besitzt eine für ABC-Transporter typische Topologie mit einer glykolysierten ersten Schleife im Extrazellulärraum [68, 69] (Tabelle 1.1). Die beiden MSD des ABC-Transporters sind zu 43% zueinander homolog [106].

### 1.5.1 Substrate und Inhibitoren

Das unidirektionale P-GP transportiert Substrate von basolateral nach apikal [34, 68]. Hierbei weist der ABC-Transporter eine breite Substratspezifität auf und ist für den Transport zahlreicher Arzneistoffe verantwortlich [5, 68, 104]. P-GP ist ein



entscheidender Faktor, der bei der Entstehung der *Multidrug Resistance* beteiligt ist, das heißt bei der Entstehung einer Kreuzresistenz von Tumoren gegen mechanistisch und strukturell unterschiedliche Zytostatika [189].

In Tabelle 1.2 sind Beispiele der bisher bekannten P-GP-Substrate aufgelistet. Die Arzneistoffklasse Chemotherapeutika wird in Tabelle 1.3 getrennt dargestellt.

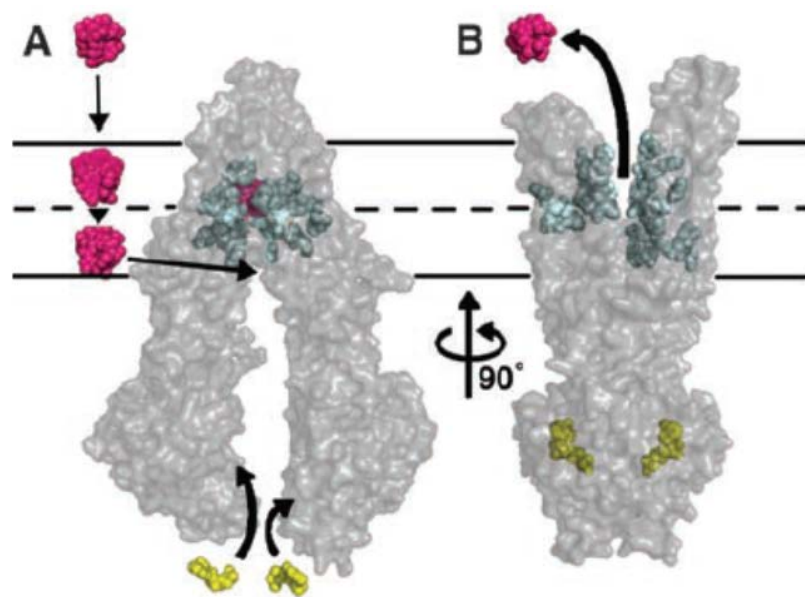
**Tabelle 1.2: P-GP-Substrate aus verschiedenen Arzneistoffklassen.**

Arzneistoffklasse	Vertreter
Analgetika	Morphin [68], Methadon [68]
Antibiotika	Valinomycin [68]
Antidiarrhoika	Loperamid [166]
Antiemetika	Ondansetron [68, 166], Domperidon [68, 166]
Fluoreszenzmarker	Calcein-AM [104], Rhodamine 123 [24], Hoechst 33342/33258 [104]
Peptidantibiotika	Gramicidin [68]
Herzglykoside	Digoxin [69, 145]
H <sub>2</sub> -Rezeptorantagonisten	Cimetidin [166]
HIV-Protease-Inhibitoren	Saquinavir [68, 104], Ritonavir [68, 104], Nelfinavir [68, 166]
Insektizide	Ivermectin [165]

**Tabelle 1.3: P-GP-Substrate aus der Arzneistoffklasse Chemotherapeutika.**

Zytostatikaklasse	Vertreter
Actinomycine	Actinomycin D [68, 104]
Alkylantien	Mitomycin [5, 68]
Anthrazykline	Daunorubicin [68, 104], Doxorubicin [104], Mitoxantron [5, 68]
Colchicumalkaloide	Colchicin [5, 68]
Dihydrofolatreduktase-Inhibitor	Methotrexat [34, 166]
Podophyllotoxine	Etoposid [5], Teniposid [5, 68]
Taxole	Paclitaxel [5], Docetaxel [5, 68]
Topoisomerasehemmer	Topotecan [5], Irinotecan [5]
Vincaalkaloide	Vinblastin [5, 72, 165], Vincristin [5]

Das ABCB1/MDR1-kodierte P-GP erkennt hunderte von unterschiedlichen chemischen Verbindungen, welche untereinander beziehungslos sind [166]. Ihre Gemeinsamkeit betrifft lediglich den amphiphilen Charakter, der für den Transport via P-GP notwendig ist [166]. Ein Modell des Substrattransportes durch P-GP ist in Abb. 1.4 dargestellt. Bei der Bindung eines hydrophoben Substrates an P-GP bindet ATP an die NBD des ABC-Transporters [1]. Infolgedessen kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch die Substratbindungsstelle zur extrazellulären Seite exponiert wird. Wegen der hydrophilen Eigenschaft der Substrate werden diese auf der apikalen Seite der Zellmembran freigesetzt.



**Abb. 1.4: Modell des Substrattransportes durch P-GP, entnommen aus [1].**

(A) Nach Diffusion eines P-GP-Substrates (magenta) durch die Plasmamembran bindet das Substrat an die Substratbindungsstelle des P-GP (zyanblau). (B) ATP-Moleküle (gelb) binden anschließend an die NBD des ABC-Transporters. Durch die darauffolgende Konformationsänderung Richtung extrazellulärer Seite wird das Substrat in den Extrazellulärraum transportiert.

Der Efflux von P-GP-Substraten kann von Phase I- und Phase II-metabolisierenden Enzymen, wie beispielsweise den Cytochrome P450 (CYP450)-Genen, mitreguliert werden. P-GP und die CYP450-Subgruppe CYP3A, die auf dem gleichen Chromosom in unmittelbarer Nähe lokalisiert sind (P-GP: 7q21.1; CYP3A: 7q22.1) [3], werden durch NR1I2 (*Nuclear Receptor Subfamily 1, Group I, Member 2*; Synonym: PXR (*Pregnan-X-Receptor*)) transkriptionell reguliert [57]. Durch die Überlappung einiger ihrer Substrate [225] kontrollieren P-GP und CYP3A die Limitierung der Bioverfügbarkeit dieser Substanzen gemeinsam.

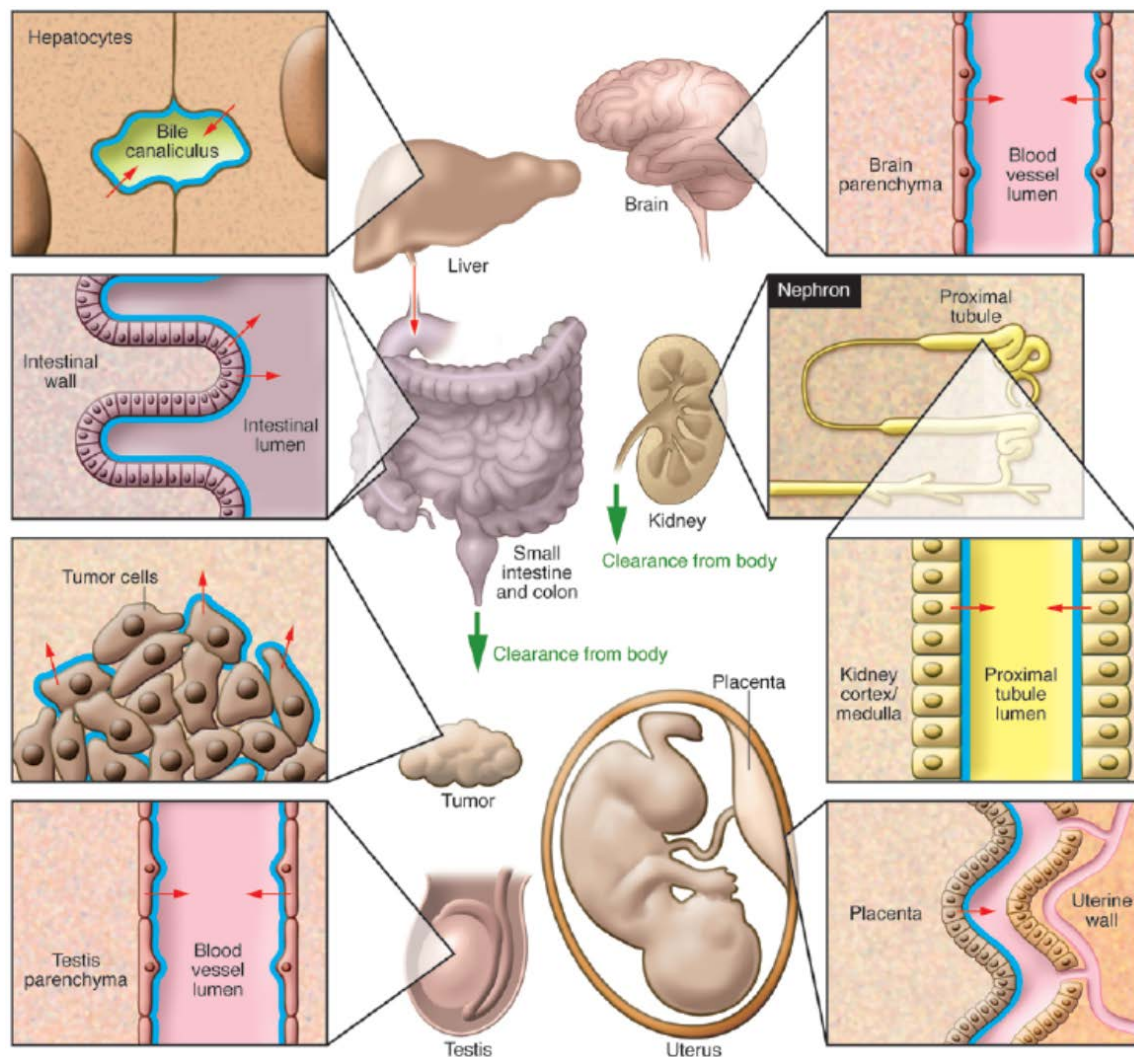
Um die P-GP-abhängige Resistenz gegenüber verschiedenen Medikamenten pharmakologisch zu überwinden und so gegebenenfalls klinisch eine höhere Effizienz der Arzneimittel zu erreichen, wurden unterschiedliche P-GP-Inhibitoren entwickelt [5]. In Tabelle 1.4 sind einige dieser Inhibitoren aufgelistet.

**Tabelle 1.4: P-GP-Inhibitoren.**

<b>Arzneistoffklasse</b>	<b>Vertreter</b>
Antibiotika	Erythromycin [5, 166]
Antiöstrogene	Tamoxifen [5, 104]
Beta-Blocker	Propranolol [104]
Calciumantagonist	Verapamil [205], Nifedipin [5], Diltiazem [5]
Immunsuppressiva	Cyclosporin A [205]
Neuroleptika	Chlorpromazin [5, 104]
Steroidhormone	Progesteron [5], Hydrocortison [166, 205]

### 1.5.2 Signaltransduktion

Der ABC-Transporter P-GP wird in der Zellmembran vor allem von Geweben mit einer spezifischen Exkretion- bzw. Barrierefunktion exprimiert, wie z.B. im Darm oder der Plazenta, aber auch in endothelialen Zellen der Blut-Hirn-Schranke [2, 12] (Abb. 1.5). Die apikale Lokalisation des P-GP ermöglicht den zellulären Efflux von toxischen Substanzen in das Lumen des jeweiligen Organs [68].

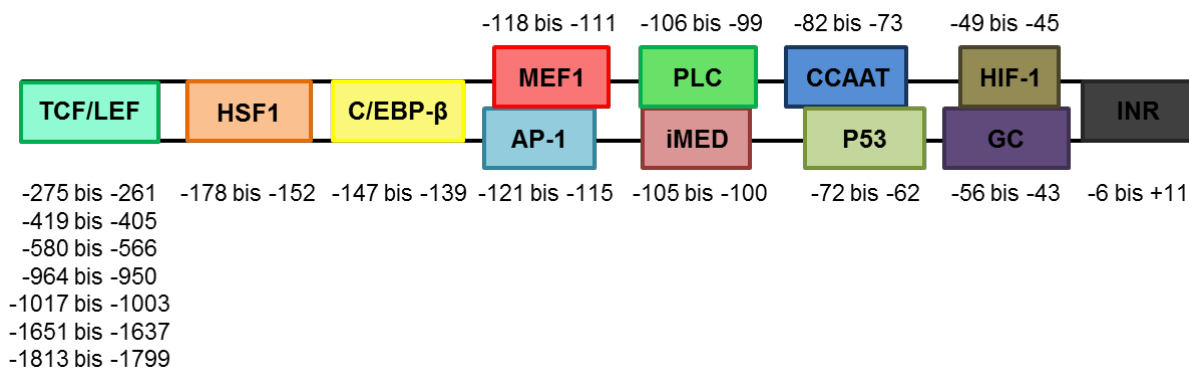


**Abb. 1.5: Übersicht der funktionellen Expression des P-GP-Transporters, entnommen aus [12].** Der ABC-Transporter P-GP wird unter anderem im Gehirn (*Brain*), Dünn- und Dickdarm (*Small intestine and colon*), sowie in der Leber (*Liver*) und Niere (*Kidney*), aber auch in Tumoren hoch exprimiert. Eine niedrige P-GP-Expression wurde in Haut, Herz, Magen, Ovarien, Hoden (*Testis*) und Uterus detektiert. Die blaue Linie spiegelt die Lage des P-GP im jeweiligen Organ wieder. Der rote Pfeil zeigt die Transporthichtung des ABC-Transporters.

Die Gen- bzw. Proteinexpression des ABC-Transporters ist konstitutiv oder induzierbar in einzelnen Zelltypen der intestinalen Lamina Propria, unter anderem am apikalen Pol der IEC oder in Monozyten/Makrophagen, nachweisbar [66, 141].

Zahlreiche umweltbedingte wie auch pathologische Faktoren und Signalwege beeinflussen die komplexe Regulation und Funktion des ABCB1/MDR1-kodierten P-GP [66]. Erklärbar ist dies möglicherweise durch die vielen Bindungsstellen des ABCB1/MDR1-Promotors, an die jeweils unterschiedliche P-GP-modulierende Transkriptionsfaktoren binden [78, 96, 170] (Abb. 1.6). Die Transkription des ABC-

Transporters wird durch ein Initiator-Element (INR) reguliert (Position: -6 bis +11) [202].



**Abb. 1.6: Schematischer Aufbau des ABCB1/MDR1-Promotors, entnommen aus [78, 96, 170] und modifiziert.**

Der ABCB1/MDR1-Promotor setzt sich aus verschiedenen Elementen zusammen, die sich teilweise überlappen. Angegeben sind die Positionen der jeweiligen Promotorelemente.

Die hohe P-GP-induzierte Chemotherapeutika-Kreuzresistenz von Tumoren wird unter anderem durch die Modulation des Suppressor-Proteins P53 verursacht. P53 interagiert mit einer Region des ABCB1/MDR1-Promotors (Position: -72 bis -62) [96] und inhibiert so den ABC-Transporter [196]. P53-Mutationen können als *Gain-of-Function* das ABCB1/MDR1-kodierte P-GP aktivieren und die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika erhöhen [196]. Die ABCB1/MDR1-Transkription wird ebenfalls durch die Bindung von EGR1 (*Early Growth Response 1*) oder vom PI3K-induzierten RAS (*Rat Sarcoma*) [138] an eine GC-reiche Bindungsstelle des ABCB1/MDR1-Promotors (Position: -56 bis -43) induziert [170]. Hierbei wird PI3K in Tumorzellen durch die Reduktion von PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*) aktiviert [99]. Weiterhin bindet SP1 (*SP1 Transcription Factor*) an die GC-reiche Domäne des ABCB1/MDR1-Promotors [190]; eine Deletion oder Mutation dieser Domäne führt entsprechend zum Funktionsverlust des ABC-Transporters [190].

Die Phospholipase C (PLC)-vermittelte transkriptionelle Induktion der ABCB1/MDR1-Expression ist abhängig vom RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)/MAPK-Signalweg (Position: -106 bis -99) [170, 223]. So verstärkt die Koexpression des konstitutiv aktiven V (Viral)-RAF die PLC-abhängige Expression des ABC-Transporters [170, 223]. Die dominant-negative Form von RAF bzw. die Inhibitoren der MAPK hemmen die ABCB1/MDR1-Aktivität. Das inverse MED (*Multiple Start Site Element Downstream*)-1-Element, auch iMED genannt, (Position: -105 bis -100) ist

ebenfalls bei der ABCB1/MDR1-Induktion mitentscheidend [116, 170]: Mutationen dieser Domäne führen zu einer Reduktion der Transkription des ABC-Transporters.

Das Tumor-Suppressor-Gen *Adenomatous Polyposis Coli* scheint ebenfalls an der P-GP-Regulation beteiligt zu sein [221]. Der Funktionsverlust dieses Tumor-Suppressor-Gens verursacht eine nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin, einem Koaktivator des Transkriptionskomplexes TCF (*T-Cell Factor*)/LEF (*Lymphoid Enhancer Factor*) [170]. Studien zeigten, dass der TCF/LEF-Komplex den ABCB1/MDR1-Promotor durch Bindung an verschiedene ABCB1/MDR1-Promotorsequenzen (Sequenzen: zwischen -1813 und -261) aktiviert [170, 221]. Die Interaktion zwischen  $\beta$ -Catenin und dem Koaktivator CBP (*CREB-Binding Protein*) spielt ebenfalls bei der ABCB1/MDR1-Aktivierung eine Rolle [219].

Der *MDR1 Promotor-Enhancing Factor 1* (MEF1) wird mit der P-GP-vermittelten Chemotherapeutika-Resistenz von Tumoren assoziiert (Sequenz: -118 bis -111) [132, 170]: Im Gegensatz zu Arzneimittel-resistenten Zellen ist in medikamentensensitiven HL60-Zellen keine MEF1-Expression nachweisbar. Weiterhin wurde in MCF-7-Zellen gezeigt, dass NF- $\kappa$ B ebenfalls an die MEF1-Promotorsequenz bindet [131, 170] und möglicherweise so den ABC-Transporter reguliert. Ferner wird der TNF $\alpha$ -vermittelte NF- $\kappa$ B-Signalweg mit Vincristin- und Doxorubicin-resistenten Zellen assoziiert [55].

Das ABCB1/MDR1-kodierte P-GP wird darüber hinaus durch unterschiedliche Stressfaktoren moduliert. Eine Vielzahl an Chemotherapeutika (Tabelle 1.3) führt z.B. zur Aktivierung von JNK, welche mit einer erhöhten ABCB1/MDR1-Expression korreliert [134]. Diese Proteinkinase phosphoryliert und induziert den Transkriptionsfaktor AP-1 [216]. Da der ABCB1/MDR1-Promotor eine AP-1-Bindungsstelle besitzt (Sequenz: -121 bis -115 [170]) und AP-1 die ABCB1/MDR1-Transkription initiiert, könnte JNK über AP-1 die mRNA-Expression des ABC-Transporters hochregulieren [189]. Außerdem wird P38-MAPK ebenfalls mit der Induktion der P-GP-Expression in Verbindung gebracht [6]: So wurde nachgewiesen, dass die P-GP-abhängige Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Vincristin nach Inhibierung des P38-MAPK-Signalweges verringert wird. Der Transkriptionsfaktor NR1I2, der durch verschiedene Stimuli, wie Abx, induziert wird, reguliert auch die ABCB1/MDR1-mRNA-Genexpression [58].

Der ABC-Transporter P-GP wird bei akuten Entzündungen hochreguliert [170]. Während der akuten inflammatorischen Phase werden pro-inflammatorische Zytokine, wie IL6, freigesetzt [170]. Die anschließende Zytokin-vermittelte Induktion von C/EBP- $\beta$  (*CCAAT/Enhancer-Binding Protein*), welches auch eine Bindungsstelle am ABCB1/MDR1-Promotor besitzt (Sequenz: -147 bis -139 [96]), führt daraufhin zu einem Anstieg der P-GP-Aktivität [29]. COX-2 scheint bei der Zytokin-induzierten ABCB1/MDR1-Aktivierung ebenfalls beteiligt zu sein [144].

Der Hitzeschock, als ein weiterer P-GP-induzierender Stressfaktor, aktiviert HSF (*Heat-Shock-Faktoren*) via PKA (Protein Kinase A) oder RAF-Kinase, die anschließend an die HSE (*Heat-Shock-Element*)-Domäne des ABCB1/MDR1-Promotors (Sequenz: -178 bis -152 [170]) binden [90]. Eine Inhibierung dieser Bindung führt zur Hemmung der basalen ABCB1/MDR1-Transkription und anschließend zu einer höheren Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika [91]. Als zusätzlicher Stressfaktor reguliert Hypoxie die P-GP-Expression mittels HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*) (Sequenz: -49 bis -45), SP1 oder JNK [30, 105].

Neben den unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren ist die Superstruktur des Chromatins bei der transkriptionellen P-GP-Regulation mitentscheidend [78]: So wurde gezeigt, dass sowohl die Inhibierung der HDAC (Histon-Deacetylase) als auch die Aktivierung der HAT (Histon-Acetylase) die Signaltransduktion von P-GP induziert. Die Bindung des Transkriptionsfaktors NF-Y (*Nuclear Transcription Factor-Y*) an die inverse CCAAT-Box (Sequenz: -82 bis -73) ist hierbei essentiell [78, 170]. Es wird vermutet, dass durch unterschiedliche Stress-Stimuli, wie Chemotherapeutika oder Bestrahlung, HAT durch Transkriptionsfaktoren, wie NF-Y, rekrutiert wird, wodurch eine Modulation der Chromatinstruktur des ABC-Transporters initiiert wird. Diese führt anschließend zu der Aktivierung des ABCB1/MDR1-kodierten P-GP [78, 170]. Der Grad der DNA-Methylierung scheint invers mit der ABCB1/MDR1-Expression zu korrelieren [170].

### 1.5.3 Genetischer Verlust

Die Bedeutung des Abc-Transporters P-gp beim körpereigenen Schutz vor toxischen Substanzen wurde anhand von MDR1A KO-Mäusen bewiesen. Schinkel *et al.* beschrieben 1994, dass die phänotypisch unauffälligen Mdr1a-defizienten Mäuse zwar lebensfähig und fertil sind, aber eine Störung der Blut-Hirn-Schranke mit einer erhöhten gastrointestinalen Absorption und einer verringerten Leber- und Nierenexkretion von P-gp-Substraten aufweisen [165]. Folgestudien bestätigten die signifikant erhöhte Bioverfügbarkeit von P-gp-Substraten, wie Chemotherapeutika, in MDR1A KO-Mäusen [183]. Die Defizienz des Abc-Transporters führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber diesen Substraten [165].

Bis zu 25% der Mdr1a-defizienten Mäuse mit einem FVB/N-Hintergrund entwickeln ab einem Alter von zwölf Wochen eine spontane Colitis unter SPF (*Specific Pathogen Free*)-Bedingungen [43, 44, 141]. Diese ähnelt histopathologisch der humanen Colitis Ulcerosa (CU). Bei konventioneller Haltung zeigen bis zu 100% der MDR1A KO-Mäuse Entzündungen im Darm [154]. Nach einer prophylaktischen oder therapeutischen Breitbandantibiotika-Behandlung wird die spontane Colitis in Mdr1a-defizienten Mäusen abgemildert [44, 141]. Demnach ist das Abcb1/Mdr1-kodierte P-gp nicht nur beim Schutz vor medikamenten-induzierter Toxizität, sondern auch bei der Regulation der physikalischen Barriere zwischen den luminalen Antigenen und dem intestinalen Epithel beteiligt. So werden bei Verlust des Abc-Transporters das *Gap-Junction*-Protein Cx43 (Connexin 43) und das Tjp1 (*Tight-Junction*-Protein 1; Synonym: ZO-1 (*Zonula Occludens 1*)) bei Colitis dereguliert, wodurch es zu einer Dysfunktion der Barriereintegrität kommt [43].

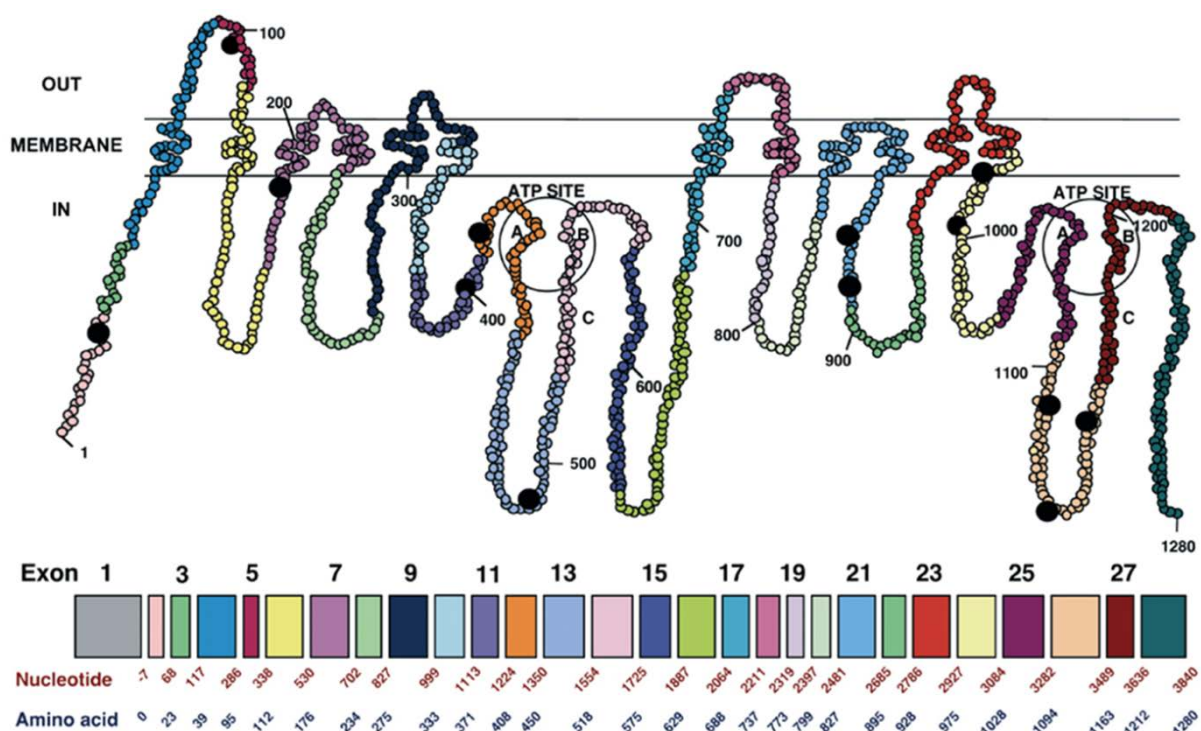
Weiterhin wurde gezeigt, dass der Abc-Transporter P-gp eine differentielle Beeinflussung der Krankheitsentwicklung durch verschiedene Bakterienspezies hat. Die Infektion mit *Helicobacter (H.) hepaticus* führt in MDR1A KO-Mäusen zu einer abgemilderten Colitis, während *H. bilis* und *Listeria monocytogenes* mit einer Exazerbation der Colitis in Mdr1a-defizienten Mäusen assoziiert werden [110, 128]. Infektionen mit Nematoden oder Viren wie auch eine Hochfettdiät in MDR1A KO-Mäusen triggern ebenfalls den Fortschritt der Colitis [9, 101, 140]. Es wurde aber auch gezeigt, dass die P-GP-Aktivität durch pathogene Bakterien, wie *Salmonella (S.) typhimurium*, reguliert werden kann [174].



Es wird angenommen, dass der primäre Defekt in der intestinalen Epithelbarriere zu einer Deregulation der angeborenen Immunantwort führt [185]. Jedoch wurde bereits vor Colitis-Entwicklung in Mdr1a-defizienten Mäusen eine verringerte Expression der induzierten  $\text{Cd4}^+\text{Foxp3}^+$ -regulatorischen T-Zellen, den sogenannten iTreg-Zellen, detektiert [194]. Dies legt nahe, dass zusätzlich auch ein zentraler Defekt in der Regulation der erworbenen Immunität vorliegen müsste.

### 1.5.4 Polymorphismen

Zahlreiche Erkrankungen sind mit SNP des ABC-Transporters P-GP assoziiert worden. Bisher sind ungefähr 50 verschiedene ABCB1/MDR1-SNP beschrieben worden [2], von denen allein 14 mit der Modifikation der P-GP-Funktion assoziiert sind [217]. In Abb. 1.7 sind diejenigen SNP dargestellt, die in den Exons des ABCB1/MDR1-Gens liegen.



**Abb. 1.7: Schematische Darstellung der einzelnen SNP, entnommen aus [2].**

Die meisten der bisher bekannten SNP befinden sich auf der cytosolischen Seite des ABC-Transporters P-GP. Die schwarzen Punkte zeigen jeweils die Stelle, an denen die einzelnen SNP lokalisiert sind. Die einzelnen Exons sind farblich abgegrenzt.

Einzelne Studien über ABCB1/MDR1-SNP zeigen, dass sich die Häufigkeit der hetero- bzw. homozygoten Genotypen in den einzelnen Populationen unterscheiden [2]. Während die meisten Polymorphismen von ABCB1/MDR1 in den verschiedenen ethnischen Bevölkerungsgruppen selten vertreten sind (<8%) [211], sind die drei Genvarianten C1236T (Exon 12), G2677T/A (Exon 21) und C3435T (Exon 26) in 45 bis 55% der kaukasischen Bevölkerung nachweisbar [145].

Der C3435T-Polymorphismus ist der meist untersuchte SNP des ABCB1/MDR1-Gens. Obwohl diese Mutation still ist, führt der C3435T-SNP in der kaukasischen Bevölkerung dennoch zu einer verringerten P-GP-Expression [69]: So zeigen humane Individuen mit diesem Polymorphismus eine zweifache Herunterregulation des ABC-Transporters im Duodenum, welche mit einer erhöhten Akkumulation des P-GP-Substrates Digoxin korreliert [69]. Weiterhin weisen CU-Patienten mit kaukasischem Hintergrund, im Vergleich zu gesunden Individuen und MC-Patienten, ein erhöhtes Aufkommen des 3435T-Allels auf [67]. Es gibt Hinweise, dass dieser Genotyp zu einem Defekt der Immunabwehr von intestinalen Bakterien bei CU führen könnte. Allerdings bestätigen andere Studienergebnisse die Assoziation zwischen CU und dem C3435T-SNP nicht [31].

Zunächst wurde vermutet, dass der C3435T-Polymorphismus die Resistenz gegenüber anti-epileptischen Medikamenten verringert und zur erhöhten Chemotoxizität führt [64]. Verschiedene Studien zeigen aber auch hier widersprüchliche Ergebnisse [64]. Zudem ist die Genvariante C3435T mit der Tumor-Pathogenese (z.B. akute lymphatische Leukämie) assoziiert [213]. Manche Krebs-Patienten weisen, im Vergleich zu gesunden Versuchspersonen, eine signifikant höhere 3435T-Allelfrequenz auf. Der C3435T-Polymorphismus wird auch mit einem erhöhten Risiko einer Parkinson-Erkrankung in Verbindung gebracht [54]. Hingegen wurde beschrieben, dass der C3435T-SNP zu einem verbesserten Behandlungserfolg bei HIV (Humane Immundefizienz-Virus)-Patienten durch anti-retrovirale Arzneimittel führt [46]. Diese Einzel-Beobachtung konnte jedoch bisher nicht untermauert werden [127].

Der Polymorphismus G2677T/A korreliert, wie auch C3435T, mit einer verringerten P-GP-Expression bzw. –Aktivität, welche zu erhöhter Chemotoxizität führt [102, 157].

Krebs-Patienten mit dem G2677T/A-SNP weisen beispielsweise nach Morphinbehandlung, im Vergleich zu Patienten ohne P-GP-Mutationen, schwerwiegendere Nebenwirkungen, wie Benommenheit oder Halluzinationen, auf [157]. Des Weiteren wird diese Genvariante auch mit CU in Verbindung gebracht [133]. Es wird davon ausgegangen, dass die SNP C3435T und G2667T in einem Kopplungsungleichgewicht liegen [67]: Der Haplotyp 3435T/G2677 z.B. zeigt eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber CU, während der Haplotyp C3435/2677T vor der CU-Ausprägung schützt [67]. Patienten, die für den 3435T- und 2677T-Genotyp gleichzeitig homozygot sind, weisen die häufigste CU-Erkrankungsrate auf. Weiterhin steigt die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs bei akuter myeloischer Leukämie, wenn die Patienten beide Polymorphismen besitzen [74]. Möglicherweise können die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien über den C3435T-Polymorphismus durch das Kopplungsungleichgewicht der beiden SNP C3435T und C2677T erklärt werden [48].

Zusammengefasst kann eine Modulation bzw. Herunterregulation des ABC-Transporters P-GP bei Behandlungen von Krankheiten zu einer erhöhten Nebenwirkungsrate führen. Das ABCB1/MDR1-kodierte P-GP scheint jedoch auch eine direkte Bedeutung bei der Pathogenese von zahlreichen Krankheiten zu haben.

## 1.6 Zielsetzung

Die intestinale Mukositis ist die häufigste Nebenwirkung unter zytostatischer Chemotherapie. Die Pathogenese ist im Detail ungeklärt. Die Chemotherapie-induzierte intestinale Mukositis beeinträchtigt erheblich die Morbidität und damit die Lebensqualität der Krebspatienten und ist bisher nur unzureichend behandelbar.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss der angeborenen Immunität durch TLR-Signalwege in der Pathophysiologie der Chemotherapie-vermittelten intestinalen Mukositis *in-vitro* und *in-vivo* zu analysieren.

Es sollten im Rahmen eines murinen Modells der Chemotherapie-induzierten intestinalen Mukositis mehrere Mausstämme parallel (WT-, TLR2 KO-, MD-2 KO- und TLR2/MD-2 dKO-Mäuse) untersucht werden. Als repräsentatives Chemotherapeutikum wurde MTX eingesetzt. Die Mäuse wurden auf verschiedene klinisch-pathologische Parameter im Verlauf der MTX-induzierten intestinalen Mukositis untersucht, einschließlich detaillierter Histopathologie der einzelnen Abschnitte des Gastrointestinaltraktes. Genexpressionsprofile im proximalen Jejunum nach MTX-Behandlung sollten mit DNA-*Microarrays* (Affymetrix), *Ingenuity®-Pathway* und *HeatMap*-Analysen charakterisiert und ausgewählte Gene (entzündlicher Gewebsschaden, xenobiotischer Metabolismus) mittels quantitativer *Realtime* Reverse-Transkriptions-PCR (qRT-PCR) bestätigt werden. Mukosaler oxidativer Stress, inflammatorische Infiltrate und Genotoxizität sollten mittels Myeloperoxidase (MPO)-*Enzyme Linked Immunosorbent-Assay* (ELISA) bzw. Immunfluoreszenz (konfokale Lasermikroskopie und Lichtmikroskopie mit strukturierter Beleuchtung) untersucht werden. Mechanistische *in-vitro*-Untersuchungen, unter anderem von Transporter-Efflux via ABCB1/MDR1-kodiertem P-GP, von Apoptose und metabolischer Aktivität, sollten die funktionelle Interaktion zwischen TLR2 und P-GP klären. Schließlich sollten in einem Therapieversuch Mikrobiota-depletierte WT-Mäuse nach MTX-Gabe mit dem spezifischen TLR-Liganden PCSK behandelt werden und das Ausmaß der zellulären Chemotherapie-induzierten Toxizität charakterisiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien, Chemikalien und Geräte

Englische Wörter sind als Eigennamen in dieser Auflistung nicht näher gekennzeichnet.

#### 2.1.1 Materialien

Aluminiumfolie, 30µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Blotting-Papier, BF2, 190g/m <sup>2</sup>	Munktell & Filtrak GmbH, Bärenstein
Blotting-Schwämme	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
BRAND® PD-Tip, 1,25ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chromatographie-Papier, 3mm Chr	GE Healthcare GmbH, München
CoolRack® MassSpec	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Deckgläser, geschliffen (kontrollierte Dicke 0,17 ± 0,01mm; 50 x 24mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim
Deckgläser, 24 x 36mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
EasySep™-Magnet	STEMCELL Technologies SARL, Köln
Einmalskalpell*	Servoprax® GmbH, Wesel
Einmalwägeschalen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eppendorf Reaktionsgefäße DNA LoBind, 1,5ml*	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Reaktionsgefäße Protein LoBind, 1,5ml*	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Reaktionsgefäße SafeLock, 0,5ml, 1,5ml, 2ml*	Eppendorf AG, Hamburg
FACS-Röhrchen, 5ml*	BD Biosciences, Heidelberg
Filterspitzen 10µl/20µl*	STARLAB GmbH, Hamburg

100µl*	STARLAB GmbH, Hamburg
1000µl*	STARLAB GmbH, Hamburg
Mikropipetten Spitze für Gel mit Filter 100µl	Socorex Isba S.A., Ecublens, Schweiz
Gel Saver II Tip 1-200µl	STARLAB GmbH, Hamburg
e.p. Dualfilter T.I.P.S. 100µl*	Eppendorf AG, Hamburg
e.p. Dualfilter T.I.P.S. 200µl*	Eppendorf AG, Hamburg
e.p. Dualfilter T.I.P.S. 300µl*	Eppendorf AG, Hamburg
e.p. Dualfilter T.I.P.S. 1000µl*	Eppendorf AG, Hamburg
Heat Sealing-Film	Eppendorf AG, Hamburg
Kanülen BD Microlance™ 3	
20G x 1 1/2" - Nr.1*	BD, Heidelberg
27G x 3/3" - Nr.20*	BD, Heidelberg
27G x 3/4"*	BD, Heidelberg
Kryoröhrchen, 2ml*	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Küvetten Uvette®, 220-1600nm*	Eppendorf AG, Hamburg
Magnetstäbchen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Objektträger, 76 x 26mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Objektträger Superfrost® Plus Gold	Thermo Scientific Inc., Schwerte
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Pasteurpipette Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße, 0,5ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Petrischale*	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Poly-D-Lysine-Culture Slides, 4-Well*	Corning Inc., NY, USA
Poly-D-Lysin-Flachbodenplatte, 6-, 12-Well*	BD Biosciences, Heidelberg
PVDF-Membran Immobilon-P, Porengröße 0,45µm	Merck KGaA, Darmstadt
Rasierklingen	Apollo Herkenrath GmbH & Co. KG, Solingen

Reagent Basin, 60ml	Thermo Scientific Inc., Schwerte
Reagent Reservoir	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße, schwarz, 1,5ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Real-Time-Filterspitzen	
0,1-10µl*	Eppendorf AG, Hamburg
e.p. T.I.P.S. 100µl*	Eppendorf AG, Hamburg
e.p. T.I.P.S. 1000µl*	Eppendorf AG, Hamburg
Ritips®, 2,5ml	Ritter GmbH, Schwabmünchen
Röhrchen mit konischem Boden,	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
15ml, 50ml*	
Röntgenfilm Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare GmbH, München
Röntgenfilm CL-XPosure™ Film	Thermo Scientific Inc., Schwerte
Saranfolie	Dow Deutschland Anlagengesellschaft mbH, Schwabach/Ts.
Saranfolie	Forasarogold GmbH, Rorschacherberg
Serologische Pipetten, 5ml, 10ml, 25ml*	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Spritze, 1ml, 5ml, 10ml*	Terumo® Europe N.V., Leuven, Belgien
Spritze, 1ml, 5ml, 10ml*	BD, Heidelberg
TissueRuptor Disposable Probes	Qiagen GmbH, Hilden
Transferpipette, 3,5ml*	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Twin.Tec® Real-Time PCR-Platten 96	Eppendorf AG, Hamburg
Vakuumfilter rapid-Filtermax*	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Vernichtungsbeutel	Peter Oehmen GmbH, Essen
Vlieskompressen*	Fuhrmann GmbH, Much
Wattestäbchen	Maimed GmbH & Co. KG, Neuenkirchen
Zellkultur-Flachbodenplatten, 6-Well*	Corning Inc., NY, USA
Zellkultur-Flachbodenplatten, 96-Well*	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultur-Flaschen T75*	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber*	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellsiebe, 100µm*	BD Biosciences, Heidelberg

Mit \* markierte Materialien waren steril.

### 2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
BCP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
5-Fluorouracil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific Inc., Schwerte
6x Orange Loading Dye	Thermo Scientific Inc., Schwerte
Aceton (≥99,5%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Agarose (Ultrapure)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Aquabator-Clean™ (100x)	AppliChem GmbH, Darmstadt
BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix	BD Biosciences, Heidelberg
Bio-Rad Protein-Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
Biocoll	Merck KGaA, Darmstadt
BSA (pH 7,0)	GE Healthcare GmbH, München
β-Mercaptoethanol (≥99%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Cell Dissociation Buffer Enzyme-Free Hanks'-based	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
CryoSure-DMSO	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach/Ts.
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DNase 1	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
dNTP-Mix (10mM)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA



Enhanced Chemiluminescent-Reagenzien (Chemilumineszenz-(ECL)-Reagenzien)	PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
EDTA-Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
<i>E. coli</i> -enhanced GFP DH5	Dr. Cathryn Nagler, University of Chicago, IL, USA
Ethanol absolute (≥99%)	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol (analytical grade)	Serva Electrophoreses GmbH, Heidelberg
Ethidiumbromid-Lösung (0,025%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fixable Viability Dye eFluor <sup>®</sup> 450	eBioscience, Frankfurt/Main
Fixable Viability Stain 450	BD Horizon <sup>™</sup> , Heidelberg
Fluorescein Methotrexate	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
GelRed <sup>®</sup>	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
HBSS	PAA, Paschin, Österreich
HBSS	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
Hoechst 33342	Thermo Scientific, Schwerte
Human Fc Receptor Binding Inhibitor	eBioscience, Frankfurt/Main
ImmEdge Pen	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Incuwater-Clean <sup>™</sup> (100x)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Invigname's GnomePen	Invigname, Be'er Sheva, Israel
Isoflurane Forene (100%)	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kompensationsbeads, BD <sup>™</sup> CompBeads	BD Biosciences, Heidelberg
LPS <i>E. coli</i> (ultrarein, Serotyp R515 (Re) flüssig)	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt

Matrigel®-Zellkultureinsätze, 8µm	Corning Inc., Corning, NY, USA
Mäusefutter: ssniff® M-Z autoklavierbar	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Methanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Methotrexate	Pfizer Pharma GmbH, Berlin
Nagellack	diverse
Natriumchlorid (0,9%)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumchlorid	Gerbu Biochemie GmbH, Heidelberg
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Normales Ziegenserum	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris SDS Page-Gel	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® LDS Sample-Puffer (4x)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® MOPS SDS-Laufpuffer (20x)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® Sample Reducing Agent	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® Transferpuffer (20x)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
Öl für Immunfluoreszenz Immersol™ 518F	Carl Zeiss AG, Oberkochen
P-Glycoprotein Inhibitor, C-4	Merck KGaA, Darmstadt
Pam <sub>3</sub> Cys-SK <sub>4</sub> x 3HCl (PCSK) (Lot A15)	EMC Microcollections GmbH, Tübingen
PCR Puffer (10x, ohne MgCl <sub>2</sub> )	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
PCR Puffer (10x)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
PFA (16%)	Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
PBS (ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA

PBS (ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	PanBiotech, Aidenbach
PBS (pH 7,4, in Pulverform)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
Platinum Taq-Polymerase	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
RNAlater <sup>®</sup>	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
RNase Zap Tücher	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
RNase-freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden
Röntgenentwickler-Konzentrat (5x)	Adefo Chemie GmbH, Dietzenbach
Röntgenfixierer-Konzentrat (5x)	Adefo Chemie GmbH, Dietzenbach
Salzsäure (37%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SDS-Lösung (10%)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
SimplyBlue™ SafeStain	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
TAE-Puffer (50x)	Qiagen GmbH, Hilden
TE-Puffer (pH 7,0, steril)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
Tissue-Tek <sup>®</sup> O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan de Rijn, Niederlande
TO-PRO <sup>®</sup> -3 Iodide (642661)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
Tris	MP Biomedicals GmbH, Eschwege
Triton X-100 (10%)	Thermo Scientific Inc., Schwerte
Trypanblau-Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
TUNEL-Assay, In Situ Cell Death Detection-Kit, FITC	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
TUNEL-Assay, In Situ Cell Death Detection-Kit, TMR red	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
Tween <sup>®</sup> -20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

---

Vancomycin	ratiopharm GmbH, Ulm
VECTASHIELD®-Mounting-Medium	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
VECTASHIELD®-Mounting-Medium mit DAPI	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
VECTASHIELD®-Mounting-Medium mit PI	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Xylen-Ersatz	Thermo Scientific Inc., Schwerte
Zienam®	MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar

### 2.1.3 Größenstandards

O'GeneRuler™ Express DNA Ladder	Thermo Scientific Inc., Schwerte
MagicMark™ XP	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained-Standard	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA

### 2.1.4 Lösungen und Puffer

Ammoniumchlorid-Lösung	155mM NH <sub>4</sub> Cl 10mM KHCO <sub>3</sub> 0,1mM EDTA-Na <sub>2</sub> ad 1l mit Aqua dest.
DTT	1M in Aqua dest.
FACS-Puffer	2% FCS in PBS (ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )
Lysepuffer V	1% Triton X-100 150mM NaCl 20mM Tris-HCl pH 7,5 2mM EDTA ad 50ml mit Aqua dest.

---

Milch-Blockpuffer	5% Magermilchpulver in TBST oder PBST
MOPS SDS-Laufpuffer	250ml NuPAGE <sup>®</sup> MOPS SDS-Laufpuffer (20x) 4750ml Aqua dest.
PBST	1 Beutel PBS pH 7,4 1000ml Aqua dest. 0,05% Tween <sup>®</sup> -20
PMSF	0,1M in Isopropanol
QUANTI-Blue™	1 Beutel in 100ml Aqua dest.
Röntgenentwickler-Lösung	200ml Röntgenentwickler-Konzentrat (5x) 800ml Aqua dest.
Röntgenfixier-Lösung	200ml Röntgenfixierer-Konzentrat (5x) 800ml Aqua dest.
Stripping-Puffer	10ml 10% SDS-Lösung 3,125ml Tris-HCl pH 6,8 300µl β-Mercaptoethanol ad 50ml mit Aqua dest.
TAE Puffer	20ml TAE-Puffer (50x) 980ml Aqua dest.
TBS (10x)	10mM Tris 150mM NaCl in Aqua dest. pH 7,6
TBST (1x)	100ml TBS (10x) 900ml Aqua dest. 0,05% Tween-20
Transferpuffer	250ml NuPAGE <sup>®</sup> Transferpuffer (20x) 500ml Methanol 4250ml Aqua dest.

## 2.1.5 Antikörper und Primer

### 2.1.5.1 Humane qRT-PCR-Primer

<b>GEN</b>	<b>Assayname</b>	<b>Hersteller, Katalognummer</b>
GAPDH	Hs_GAPDH_2_SG	Qiagen, QT01192646
IL6	Hs_IL6_1_SG	Qiagen, QT00083720
IL10	Hs_IL10_1_SG	Qiagen, QT00041685
IL33	Hs_IL33_1_SG	Qiagen, QT00041559
MUC2	Hs_MUC2_2_SG	Qiagen, QT01004675
TFF3	Hs_TFF3_1_SG	Qiagen, QT00014546

### 2.1.5.2 Murine qRT-PCR-Primer

<b>GEN</b>	<b>Assayname</b>	<b>Hersteller, Katalognummer</b>
Abcb1 $\alpha$	Mm_Abcb1a_SG	Qiagen, QT01753416
Abcb1 $\beta$	Mm_Abcb1b_SG	Qiagen, QT00140945
Abcc1	Mm_Abcc1_1_SG	Qiagen, QT00139776
Abcc2	Mm_Abcc2_1_SG	Qiagen, QT00120379
Abcc4	Mm_Abcc4_2_SG	Qiagen, QT01532321
Abcg2	Mm_Abcg2_1_SG	Qiagen, QT00173138
Alpi	Mm_Alpi_1_SG	Qiagen, QT00264425
Casp1	Mm_Casp1_1_SG	Qiagen, QT00199458
Cyp1a1	Mm_Cyp1a1_1_SG	Qiagen, QT00105756
Cyp1b1	Mm_Cyp1b1_2_SG	Qiagen, QT01076999
Cyp2c29	Mm_Cyp2c29_2_SG	Qiagen, QT01750763
Gapdh	Mm_GAPDH_3_SG	Qiagen, QT01658692
Il1r1	Mm_Il1r1_1_SG	Qiagen, QT00095256
Il1r2	Mm_Il1r2_1_SG	Qiagen, QT00101157
Il1rl1	Mm_Il1rl1_2_SG	Qiagen, QT01761088
Il17f	Mm_Il17f_1_SG	Qiagen, QT00144347
Il18	Mm_Il18_1_SG	Qiagen, QT00171129
Il33	Mm_Il33_1_SG	Qiagen, QT00135170
Ly6g	Mm_Ly6g_1_SG	Qiagen, QT00529655

---

Lcn2	Mm_Lcn2_1_SG	Qiagen, QT00113407
Lyz2	Mm_Lyz2_1_SG	Qiagen, QT01555701
Mmp3	Mm_Mmp3_1_SG	Qiagen, QT00107751
Mmp8	Mm_Mmp8_1_SG	Qiagen, QT00113540
Mmp10	Mm_Mmp10_1_SG	Qiagen, QT00115521
Mmp19	Mm_Mmp19_1_SG	Qiagen, QT00138089
Nlrp6	Mm_Nlrp6_2_SG	Qiagen, QT01050861
Nr1i2	Mm_Nr1i2_3_SG	Qiagen, QT02272823
Nr1i3	Mm_Nr1i3_1_SG	Qiagen, QT00099036
Sis	Mm_Sis_2_SG	Qiagen, QT01069236
Slc26a3	Mm_Slc26a3_SG	Qiagen, QT00161532
Tff3	Mm_Tff3_1_SG	Qiagen, QT00108857
Timp1	Mm_Timp1_1_SG	Qiagen, QT00996282
Tjp1	Mm_Tjp1_1_SG	Qiagen, QT00493899
Tlr4	Mm_Tlr4_1_SG	Qiagen, QT00259042
Vil1	Mm_Vil1_1_SG	Qiagen, QT00172935

### 2.1.5.3 Western-Blot Antikörper

Primärantikörper	Wirt	Klon	Hersteller, Katalognummer
β-Aktin	Maus	AC-74	Sigma-Aldrich Chemie, A 5316
Phospho-MKK3 (Ser189)/MKK6 (Ser207)	Kaninchen		Cell Signaling, 9231
MKP1 (D-3)	Maus		Santa Cruz Biotechnology, sc-271684
P38-MAPK	Kaninchen		Cell Signaling, 9212
Phospho-P38-MAPK (Thr180/Tyr182)	Kaninchen	D3F9	Cell Signaling, 4511
Cleaved-PARP (Asp214)	Kaninchen		Cell Signaling, 9541
P-Glycoprotein	Maus	C219	Merck Millipore, 517310

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Hersteller, Katalognummer</b>
ECL Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	Esel	GE Healthcare, NA934
ECL Anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt	Schaf	GE Healthcare, NA931

#### 2.1.5.4 Antikörper für Immunfluoreszenz

<b>Primärantikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller, Katalognummer</b>
CD4	Ratte	RM4-5	BD Pharmingen, 550280
CD11b	Ratte	M1/70	BD Pharmingen, 553308
Phospho- $\beta$ -Catenin (Ser675)	Kaninchen	D2F1	Cell Signaling, 4176
Phospho-Histone H2A.X (Ser139)	Kaninchen	20E3	Cell Signaling, 9718
Phospho-Histone H3 (Ser10)	Kaninchen	D2C8	Cell Signaling, 3377
TFF3	Kaninchen	HM 5119	Dr. D.K. Podolsky, Massachusetts General Hospital, Boston, USA
p-Glycoprotein	Maus	C219	Calbiochem, 517310

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Hersteller, Katalognummer</b>
Alexa Fluor <sup>®</sup> 350 Anti-Maus	Ziege	Life Technologies, A-21049
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Anti-Kaninchen	Ziege	Life Technologies, A-11034
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Anti-Maus	Ziege	Life Technologies, A-11029
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Anti-Ratte	Ziege	Life Technologies, A-11006
Alexa Fluor <sup>®</sup> 647 Anti-Maus	Ziege	Life Technologies, A-21235
Alexa Fluor <sup>®</sup> 647 Anti-Ratte	Ziege	Life Technologies, A-21247



### 2.1.5.5 Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper	Wirt	Endkonzentration	Hersteller, Katalognummer
CD11b - PE	Maus	16,7% in FACS-Puffer	BD Pharmingen, 553457
CD11c - APC	Maus	8,3% in FACS-Puffer	Beckman Coulter, IM2475
CD14 - FITC	Maus	8,3% in FACS-Puffer	Dako, F0844

### 2.1.5.6 Primer zur Genotypisierung

Gen	Primernamen	Sequenz	Länge
TLR2	IMR3041	5'-CTTCCTGAATTTGTCCAGTACA-3'	WT: 499bp
	IMR3043	5'-GGGCCAGCTCATTCTCCAC-3'	KO: 334bp
	IMR3091	5'-ACGAGCAAGATCAACAGGAGA-3'	
MD-2	MD-2_F NEU	5'-GTCGAGTCCGATGGTCTTCCTGGC-3'	WT: 240bp
	MD-2.1 WT	5'-CCTCCAGCTTCAGGTTCAGTG-3'	KO: 300bp
	neoA5 (MD-2)	5'-TTAAGGGCCAGCTCATTCTCCAC-3'	

Die Primer wurden alle von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg, bezogen.

### 2.1.6 Kits

CellTiter 96 <sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation-Assay	Promega, Madison, WI, USA
DNeasy Blood and Tissue-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
EasySep <sup>™</sup> Mouse CD11b Positive Selection-Kit	STEMCELL Technologies SARL, Grenoble, Frankreich
EndoFree Plasmid Maxi-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
FastDNA <sup>™</sup> SPIN Kit for Soil	MP Biomedicals, Solon, OH, USA
Fast Frozen Stain-Kit	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim
LDH Cytotoxicity Kit II	PromoCell GmbH, Heidelberg
Monocyte Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mouse MPO-ELISA	Hycult Biotech, Uden, Niederlande

---

Multidrug Resistance Direct Dye Efflux-Assay	Merck KGaA, Darmstadt
MycoAlert™ Mycoplasma Detection- Kit	Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz
One Step QuantiFast SYBR Green RT-PCR-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Prizm™ Caspase-1 Apoptosis Assay- Kit (with Red Fluorescence Substrate)	OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA
RiboPure™-Kit	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
RNase-free DNase-Set	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Mini-Kit	Qiagen GmbH, Hilden

### 2.1.7 Zellkulturmedien

Antibiotic/Antimycotic-Solution (Antibiotische/Antimykotische Lösung, AB/AM-Lösung)	GE Healthcare GmbH, München
DMEM 4,5g/l D-Glukose	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
DMEM 4,5g/l Glukose	GE Healthcare GmbH, München
EMEM	ATCC®, Wesel
Fötale Kälberserum Endotoxin-frei Lot A10112-1575	GE Healthcare GmbH, München
Fötale Kälberserum Endotoxin-frei Lot A10208-1583	GE Healthcare GmbH, München
Fötale Rinderserum HyClone® Lot RYF35911	Thermo Scientific Inc., Schwerte
G418 Sulfate	InvivoGen, San Diego, CA, USA
Gentamicin Reagent Solution (50mg/ml)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
Leibovitz L-15	GE Healthcare GmbH, München

---

Leibovitz L-15	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
L-Glutamin (100x)	GE Healthcare GmbH, München
Macrophage Medium	GE Healthcare GmbH, München
Mononuclear Cell Medium	PromoCell GmbH, Heidelberg
Normocin™	InvivoGen, San Diego, CA, USA
Penizillin/Streptomycin (100x)	GE Healthcare GmbH, München
Quanti-Blue™	InvivoGen, San Diego, CA, USA
RPMI 1640 (1x)	GE Healthcare GmbH, München
RPMI 1640 (1x)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
RPMI 1640 (ATCC® Modification)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
Trypsin-EDTA (100x)	GE Healthcare GmbH, München
Zeocin™	InvivoGen, San Diego, CA, USA

### 2.1.8 Geräte

Autoklav 2540 EL	Systec GmbH, Wettengel
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-Reader ELx808	Bio-Tek Instruments Inc., Bad Friedrichshall
Eppendorf Heat Sealer	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Realplex <sup>2</sup> Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg
FastPrep™ FP120	Thermo Savant, Illkirch, Frankreich
Geldokumentationsanlage	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Geldokumentationssystem UVsolo TS	Biometra GmbH, Göttingen
Gelelektrophorese-Apparatur Horizon® 58	Biometra GmbH, Göttingen
IKA Labdancer	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
IKA Vortex Genius 3	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen

Lumat LB 9507	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
MiSeq	Illumina, Inc, San Diego, CA, USA
Kryostat Microm HM 560	Microm International GmbH, Walldorf
Kühlblock Sample Cooler SC-2	BioSan, Riga, Lettland
Magnetrührer IKAMAG <sup>®</sup> RCT	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskope	
Aperio ScanScope <sup>®</sup>	Leica Biosystems GmbH, Nussloch
AxioObserver.Z1 with ApoTome	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Laser-Scanning-Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Axiovert 100 LSM 510	
Leica DM750	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Nikon TMS	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikrowelle HF 24M241	Siemens AG, München
pH-Meter HI 2211 pH/ORP Meter	Hann Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein
Pipetten	
Eppendorf Research <sup>®</sup> 0,1-2,5µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research <sup>®</sup> 0,5-10µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research <sup>®</sup> 10-100µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research <sup>®</sup> 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research <sup>®</sup> Pro 8-Kanal	Eppendorf AG, Hamburg
5-100µl	
Eppendorf Research <sup>®</sup> Pro 8-Kanal	Eppendorf AG, Hamburg
20-300µl	
Pipettierhilfe Pipetus <sup>®</sup>	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
PowerPac <sup>™</sup> Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
Rocky Horizontalschüttler	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau
Rollschüttler Stuart SRT9	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Röntgenkassette Rego Spezial 200	Rego X-Ray GmbH, Augsburg
Scanner EPSON Perfection V750 PRO	Epson Deutschland GmbH, Meerbusch

Schüttelinkubator Innova® 4000	Eppendorf AG, Hamburg
Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Schwingmühle Retsch MM 301	RETSCH GmbH, Haan
Sterilwerkbank LaminAir LB-72-C	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Sterilwerkbank NuAIRE Class II NU-437-400E	NuAire, Inc., Plymouth, MN, USA
Thermal Cycler Bio-Rad T100	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
Thermocycler GeneAmp PCR System 9600	PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA
Thermo-Block TDB-100	BioSan, Riga, Lettland
Thermo-Block TDB-120	BioSan, Riga, Lettland
Thermodrucker DPU-414	Seiko Instruments GmbH, Neu-Isenburg
TissueRuptor	Qiagen GmbH, Hilden
Ultraschallgerät Transsonic 460 H	Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen
Waagen	
Chyo MP-3000	Göntgen Wägetechnik GmbH, Bottrop
Kern 440-21N	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Kern ACJ 120-4M Feinwaage Navigator™	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Wasserbad Julabo Standard	Ohaus GmbH, Giessen
X-Cell II™ Blot-Module	Julabo GmbH, Seelbach
	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
X-Cell SureLock™ Mini-Cell	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
Zellkulturinkubator mit CO <sub>2</sub> HERA Cell	Thermo Scientific, Schwerte
Zellkulturinkubator ohne CO <sub>2</sub> WTB Binder B28	Binder GmbH, Tuttlingen
Zentrifugen	
Eppendorf 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf 5810R	Eppendorf AG, Hamburg

Hermle Z 233 MK-2  
Mikro 120

Hermle LaborTechnik GmbH, Wehingen  
Andreas Hettich GmbH & Co. KG,  
Tuttlingen

### 2.1.9 Software

Adobe Photoshop CS4, Version 11.0  
ArrayStar  
BD FACSDiva™  
EndNote X4  
Epson Scan, Version 3.9.2.1DE  
FlowJo, Version 7.6.5  
GraphPad Prism, Version 5.04

Adobe Systems GmbH, München  
DNASar®, Madison, WI, USA  
BD Biosciences, Heidelberg  
Thomson Reuters, New York, NY, USA  
Epson Deutschland GmbH, Meerbusch  
Tree Star Inc., Ashland, OR, USA  
GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA,  
USA

ImageJ

National Institutes of Health, Bethesda,  
MD, USA

ImageScope, Version 11.2.0.780  
Ingenuity®  
Microsoft Excel 2010

Aperio, Vista, CA, USA  
Qiagen GmbH, Hilden  
Microsoft Corporation, Redmond, WA,  
USA

Microsoft Power Point 2010

Microsoft Corporation, Redmond, WA,  
USA

Microsoft Word 2010

Microsoft Corporation, Redmond, WA,  
USA

MikroWin, Version 4.44

Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath

LSM 510 v.3.2

Carl Zeiss AG, Oberkochen

Phoretix™ grabber

Biostep GmbH, Jahnsdorf

Realplex 2.2

Eppendorf AG, Hamburg

ScanScope Console, Version  
10.2.0.23.52

Leica Biosystems GmbH, Nussloch

TS Bildaufnahme-Software,  
Version 2.4.4

Biometra GmbH, Göttingen

Zen 2012 (blue edition)

Carl Zeiss AG, Oberkochen

### 2.1.10 Datenbank

Die Daten der *Microarray*-Analyse wurden in der folgenden Datenbank hinterlegt:

GEO (GSE56426)	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
----------------	---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Jede der hier aufgeführten Zelllinien wurde regelmäßig im Verlauf der Experimente negativ auf Mykoplasmen getestet. Hierfür wurde das *MycoAlert™ Mycoplasma Detection*-Kit nach Herstellerangaben verwendet.

#### 2.2.1.1 Kultivierung von THP-1-Zellen

THP-1-Zellen sind monozytäre Zellen, die von *American Type Culture Collection* (ATCC® TIB-202™) bezogen worden sind. Die in Suspension lebenden Zellen wurden aus dem peripheren Blut eines an akuter monozytärer Leukämie erkrankten einjährigen Patienten gewonnen [198].

Die Zellen wurden in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640-Wachstumsmedium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1x L-Glutamin und 1% Penizillin/Streptomycin (PS) bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) in Kultur gehalten. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. THP-1-Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen von Passage 13 bis Passage 19 in Kultur gehalten, ihre Dichte überschritt nicht 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml Medium. Bei der Neuausplattierung wurden die Zellen bei 800g und Raumtemperatur (RT) für 5min abzentrifugiert, per Neubauer-Zählkammer gezählt (Kapitel 2.2.1.4) und in frischem Medium mit einer Dichte von 3x10<sup>4</sup> bis 3x10<sup>5</sup> Zellen/ml ausplattiert.

THP-1-XBlue™-MD-2-CD14-Zellen (InvivoGen; Lotnummer: T08-3302-01) wurden durch die stabile Transfektion der THP-1-Zellen mit einem Reporterplasmid, das die embryonale alkalische Phosphatase (SEAP) sekretiert, generiert und kommerziell

bezogen. Diese Zellen exprimieren zusätzlich dauerhaft CD14 und MD-2. Die durch TLR-aktivierte SEAP wird durch das Medium *QUANTI-Blue™* (Kapitel 2.2.6.1) nachgewiesen; hierbei ändert das Medium seine Farbe in Anwesenheit von SEAP von pink zu violett/blau.

Die THP-1-XBlue™-MD-2-CD14-Zellen wurden in RPMI 1640 (ATCC® *Modification*)-Wachstumsmedium mit 10% Hitze-inaktiviertem FCS, 100µg/ml Normocin, 200µg/ml Zeocin, 250µg/ml G418 und 1% PS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Kultur gehalten, wobei Zeocin und G418 bei jedem Mediumwechsel dem Medium frisch zugeführt worden sind. Die Zellen wurden jeden dritten bis vierten Tag mit einer Dichte von 5x10<sup>5</sup> Zellen/ml umgesetzt, um die maximale Zellkonzentration von 2x10<sup>6</sup> Zellen/ml nicht zu überschreiten. Hierfür wurden die Zellen bei 200g und RT für 5min zentrifugiert, mittels Neubauer-Zählkammer (Kapitel 2.2.1.4) gezählt und ausplattiert. THP-1-XBlue™-MD-2-CD14-Zellen wurden bis zur Passage 8 in Kultur gehalten.

## **2.2.1.2 Kultivierung von IEC**

### **2.2.1.2.1 Caco-2-Zellen**

Caco-2-Zellen (ATCC® HTB-37™, Lotnummer: 1537739) entstammen einem humanen colorektalen Adenokarzinom. Diese Colonepithelzellen mit einer enterozytenähnlichen Morphologie weisen eine typische Enterozytendifferenzierung auf [45, 65].

Das Wachstumsmedium der Caco-2-Zellen, das zweimal wöchentlich gewechselt wurde, bestand aus *Dulbecco's Modified Eagle-Medium* (DMEM) mit 20% FCS und 1% PS. Caco-2-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis Passage 17 in T75-Zellkulturflaschen kultiviert und bei einer Konfluenz von 100% passagiert. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 10ml frischem Wachstumsmedium abgespült und in ein 50ml-Röhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation bei 800g und RT für 5min wurden die Zellen nochmals im frischen Medium resuspendiert und 5 bis 20% der Zellen neu ausplattiert. Zur Zellzahlbestimmung wurden Caco-2-Zellen bei einer Konfluenz von 70-80% mit 3ml Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 4min bis zur leichten Ablösung der Zellen behandelt.



Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch 10ml Wachstumsmedium abgestoppt, die Zellen von der T75-Zellkulturflasche abgespült und bei 800g und 4°C für 5min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20ml frischem Wachstumsmedium aufgenommen und die Zellzahl, wie auch die Vitalität mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Kapitel 2.2.1.4) bestimmt.

#### **2.2.1.2.2 LS 174T-Zellen**

Bei den LS 174T-Zellen (ATCC® CL-188™, Lotnummer: 3752718) handelt es sich um die trypsinierte Variante der Zelllinie LS 180, die aus einem humanen Colon-Adenokarzinom isoliert wurde. Die Zellen bilden Mikrovilli und intrazelluläre Muzin-Vakuolen aus [197].

LS 174T-Zellen wurden in *Eagle's Minimum Essential-Medium* (EMEM) mit 10% FCS und 1% PS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zu einer Passage von 20 in T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Das Wachstumsmedium wurde zwei- bis dreimal wöchentlich gewechselt. Bei einer Konfluenz von mehr als 80% wurden 20 bis 50% der Zellen passagiert. Hierfür wurden diese zunächst mit 1ml Trypsin/EDTA gewaschen und anschließend mit 3ml Trypsin/EDTA bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 5min behandelt. Die enzymatische Reaktion wurde mit 6ml Wachstumsmedium geblockt. Im Anschluss wurden die Zellen von der T75-Zellkulturflasche abgespült und in einem 50ml-Röhrchen bei 125g für 5min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem Wachstumsmedium aufgenommen, mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt (Kapitel 2.2.1.4) und neu ausplattiert.

#### **2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

THP-1-Zellen wurden mit einer Zellzahl von ca.  $2 \times 10^6$  Zellen/ml, Caco-2- und LS 174T-Zellen mit unterschiedlichen Zellzahlen eingefroren. Hierfür wurden die Zellen zunächst in Wachstumsmedium aufgenommen. Je 1ml der Zellsuspension wurde anschließend in ein 2ml-Kryoröhrchen überführt. Nach Zugabe von 50µl Dimethylsulfoxid (DMSO) (LS 174T-Zellen; Endkonzentration: 5%) bzw. 70µl (THP-1- und Caco-2-Zellen; Endkonzentration: 7%) wurden die Zellen umgehend bei -80°C

eingefroren. THP-1-XBlue™-MD-2-CD14-Zellen wurden mit einer unterschiedlichen Zellzahl eingefroren. Als Einfriermedium diente das RPMI 1640 (ATCC® *Modification*)-Medium mit 20% FCS und 10% DMSO. Am nächsten Tag wurden alle Zellen zur längeren Lagerung in die Gasphase von flüssigem Stickstoff überführt.

Für das Auftauen von THP-1-, THP-1-XBlue™-MD-2-CD14- und Caco-2-Zellen wurden 13ml, für LS 174T-Zellen nur 9ml Wachstumsmedium in einem 15ml-Röhrchen vorgelegt. Die Zellen wurden kurz in der Hand angetaut und nach Zugabe von 1ml Wachstumsmedium in das vorbereitete Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 4°C für 5min abzentrifugiert (THP-1- und Caco-2-Zellen: bei 800g; THP-1-XBlue™-MD-2-CD14-Zellen: bei 200g; LS 174T-Zellen: bei 125g), der Überstand verworfen und die Zellen in 20ml frischem Wachstumsmedium auf T75-Zellkulturflaschen ausplattiert.

#### **2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität**

Die Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität erfolgte lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Hämatozytometer) und einem Trypanblau-Ausschluss. Trypanblau ist ein Farbstoff, der nur von toten Zellen aufgrund ihrer permeablen Zellmembran aufgenommen werden kann. In Folge dessen erscheinen tote Zellen blau, während die lebenden Zellen ungefärbt bleiben.

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10µl Trypanblau in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 10µl Zellsuspension vermischt. 10µl dieser Mischung wurden in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter einem Mikroskop untersucht. Die lebenden Zellen wurden gezählt und mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor multipliziert. Für die Vitalitätsbestimmung wurde die Lebendzellzahl durch die Gesamtzellzahl dividiert.

#### **2.2.2 Mäuse und Tierhaltung**

Gendefiziente Mäuse werden im Rahmen dieser Arbeit Knockout (KO)-Mäuse genannt. TLR2 KO-Mäuse [B6.129-*Tlr2*<sup>tm1<sup>Kir</sup></sup>/J; >F10] [218] wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) kommerziell erworben. MD-2 KO-Mäuse [126],

die freundlicherweise von Dr. Kensuke Miyake (Universität Tokio, Japan) bzw. von JST zur Verfügung gestellt wurden [C57BL6/J; >F10], wurden nach Rederivierung durch Embryotransfer (Charles River, Lyon, Frankreich) mit TLR2 KO-Mäusen für die Erzeugung von Doppel-Knockout (dKO)-Mäusen (TLR2/MD-2 dKO) gekreuzt. WT-Mäuse [C57BL6/J; >F10] wurden als entsprechende Kontrollen eingesetzt.

WT FVB/N- und MDR1A KO-Mäuse [FVB.129P2-*Abcb1a*<sup>tm1Bor</sup>; >F7], die ursprünglich von Dr. A. Schinkel (*Netherlands Cancer Institute*, Amsterdam, Niederlande) entwickelt wurden [165], wurden unter *Crossbreeding Agreement* von Taconic Farms (Germantown, NY, USA) bezogen und gehalten. Für die Erzeugung von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen sind TLR2 KO- mit MDR1A KO-Mäusen gekreuzt worden [44]. Die in dieser Arbeit aufgeführte Nomenklatur bezieht sich auf folgende Publikationen: [44, 52].

Alle Mäuse wurden im Zentralen Tierlaboratorium (ZTL) des Universitätsklinikums Essen in einem temperatur- und luftfeuchtigkeitskontrollierten Raum mit konstantem 12h Hell/Dunkel-Zyklus unter strikten SPF-Bedingungen (frei von *Murinem Norovirus* und *Helicobacter*) gezüchtet und gehalten. Die Mäuse wurden in *Filbertop*-Käfigen gehalten und mit autoklaviertem Wasser und Futter (ssniff® M-Z, ssniff Spezialdiäten, Soest; Folsäuregehalt: 10mg/kg) *ad libitum* versorgt. Anhand repräsentativer Mäuse (*Sentinels*) wurde der Gesundheitszustand der Mäuse nach FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*)-Kriterien mindestens viermal jährlich standardisiert überprüft (Gesellschaft für innovative Mikroökologie mbH, Wildenbruch).

Die Genotypisierung wurde sowohl von Herrn Dr. rer. nat. Ralph Waldschütz (ZTL) übernommen als auch im eigenen Labor durchgeführt (Kapitel 2.2.2.1). In dieser Studie wurden ausschließlich weibliche, altersgleiche Mäuse eingesetzt.

Für die Analyse der Darm-Mikrobiota wurden Mauswürfe von unterschiedlichen, heterozygoten Zuchtpaaren untersucht, um den elterlichen Einfluss auszuschließen. Die Jungtiere wurden auf einem Gestell, jedoch in einzelnen Käfigen gehalten, damit eine mögliche gegenseitige Beeinflussung unterbunden wurde, wie in [160] beschrieben.

Alle hier beschriebenen Zuchten und Tierexperimente wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Entsprechende Tierschutzgenehmigungen lagen für alle Versuche vor (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen).

### **2.2.2.1 Genotypisierung**

#### **2.2.2.1.1 DNA-Extraktion**

Zur Isolierung von genomischer DNA wurde das *DNeasy Blood and Tissue*-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurde die Mäuseschwanzspitze über Nacht bei 55°C durch Zugabe von ATL-Lysepuffer und Proteinase K lysiert. Am darauffolgenden Tag wurde die DNA präzipitiert. Nach Auftragen auf die Säulen des Kits wurde die DNA zweimal gewaschen. Danach wurde die DNA mit Hilfe von AE-Puffer und anschließender Zentrifugation eluiert. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **2.2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Hierzu werden eine hitzestabile DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Magnesium ( $Mg^{2+}$ )-Ionen und ein PCR-Puffer zur Herstellung von optimalen Bedingungen verwendet. Zudem ist jeweils ein vorwärts- und ein rückwärtsgerichteter Primer, sogenannte *forward* und *reverse* Primer, nötig. Diese umschließen die zu amplifizierenden Regionen.

Die PCR setzt sich aus 30 bis 40 Replikationszyklen zusammen, die jeweils aus drei Schritten bestehen. Zunächst findet die Denaturierung statt, bei der die DNA bei hoher Temperatur in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt wird. In der darauffolgenden *Annealing*-Phase binden die Primer spezifisch an die zu amplifizierende DNA-Sequenz. Während der Elongation füllt die DNA-Polymerase die freien Nukleotide der Einzelstränge mit dNTPs auf. Auf diese Weise wird die DNA bei jedem Replikationszyklus vermehrt.

Bei der Genotypisierung von Tlr2 und Md-2 wurde die *Platinum Taq*-DNA-Polymerase als DNA-Polymerase verwendet. Tabelle 2.1 stellt das Pipettierschema der beiden Genotypisierungsansätze dar.

**Tabelle 2.1: Pipettierschema der Tlr2- und Md-2-Genotypisierungs-PCR.**

Tlr2		
Stock	Volumen	Endkonzentration
10x Puffer-MgCl <sub>2</sub>	4µl	1x
50mM MgCl <sub>2</sub>	1,6µl	2mM
10mM dNTP-Mix	1µl	0,25mM
8µM Primer IMR3041	5µl	1µM
8µM Primer IMR3043	5µl	1µM
8µM Primer IMR3091	5µl	1µM
5U/µl <i>Platinum Taq</i> -DNA-Polymerase	0,2µl	0,025U/µl
Wasser	18,2µl	

Md-2		
Stock	Volumen	Endkonzentration
10x Puffer-MgCl <sub>2</sub>	2,5µl	1x
50mM MgCl <sub>2</sub>	1µl	2mM
10mM dNTP-Mix	1µl	0,25mM
10µM MD-2_F NEU	2,5µl	1µM
10µM MD-2.1 WT	2,5µl	1µM
10µM neoA5 (MD-2)	1µl	1µM
5U/µl <i>Platinum Taq</i> -DNA-Polymerase	0,2µl	0,04U/µl
Wasser	14,3µl	

Für die Tlr2-Genotypisierung wurden somit 40µl PCR-Mix verwendet, für die Md-2-Genotypisierung 25µl. Hinzu kamen jeweils 2µl der zu amplifizierenden DNA bzw. 2µl Wasser als Kontrolle. Für die PCR wurde der *Thermal Cycler Bio-Rad T100* oder der *Thermocycler GeneAmp PCR System 9600* mit den in Tabelle 2.2 dargestellten Programmen verwendet.

**Tabelle 2.2: PCR-Programm für die Tlr2- und Md-2-Genotypisierungs-PCR.**

	Tlr2		Md-2	
Schritt	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
1	94°C	3min	94°C	4min
2	94°C	30s	94°C	15s
3	63°C	45s	58°C	30s
4	72°C	45s	72°C	1min
5	72°C	5min	72°C	10min
6	4°C	∞	4°C	∞

} 35x

Die Auswertung der PCR erfolgte anhand der Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.2.1.3). Bis dahin wurden die Proben bei 4°C gelagert.

### 2.2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können ihrer Größe nach mittels der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. An ein Agarosegel, das in einer Pufferlösung liegt, wird ein elektrisches Feld angelegt. Die DNA wandert durch die negative Ladung in Richtung des positiv geladenen Pols der Gelkammer, wobei die kleineren Nukleinsäure-Moleküle schneller durch die Gelmatrix wandern als die größeren. Auf diese Weise wird die Auftrennung der DNA ermöglicht. Durch Zugabe von Ethidiumbromidlösung oder *GelRed* in das Gel können anschließend die DNA-Fragmente mit ultraviolettem (UV-)Licht sichtbar gemacht werden.

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auswertung der Genotypisierungs-PCR, wofür ein 2%iges Agarosegel angefertigt wurde. Hierfür wurde 1g Agarose in 50ml 1x Tris/Acetat/EDTA-(TAE)-Puffer aufgekocht. Nach kurzer Abkühlung wurden zwei Tropfen einer 0,025%igen Ethidiumbromidlösung oder 1µl von 10.000x *GelRed* hinzugefügt. Anschließend wurde die Agaroselösung nach reichlichem Schwenken in die Gelkammer, in der Kämme für die Geltaschen eingesetzt waren, gegossen. Nach Aushärtung des Gels und nach Herausnehmen der Kämme wurde das Gel mit 1x TAE-Puffer bedeckt. Um die Proben in die Geltaschen abzusenken, wurden diese mit 6x *Orange Loading Dye* oder 6x *DNA Loading Dye* versetzt und in die

entstandenen Geltaschen pipettiert. Der *O'GeneRuler™ Express DNA Ladder* diente als Größenstandard. Die DNA-Auftrennung fand bei 90V für ca. 45min statt.

Die Gele wurden mit Hilfe der Geldokumentationseinheit mit der *Phoretix™ grabber*-Software oder dem *UVsolo* mit der *TS* Bildaufnahme-Software dokumentiert und ausgewertet.

#### **2.2.2.2 Modell der Chemotherapie-induzierten intestinalen Mukositis *in-vivo***

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Ausmaß der MTX-induzierten Mukositis in verschiedenen Mausstämmen (WT- und verschiedene KO-Mäuse) untersucht.

Für das Modell der Chemotherapie-induzierten intestinalen Mukositis *in-vivo* wurden Mäuse im Alter von durchschnittlich ca. neun Wochen verwendet. Den Mäusen wurde einmal täglich von Tag 0 bis Tag 3 MTX *intraperitoneal (i.p.)* in einer Konzentration von 40mg MTX/kg Körpergewicht [7] injiziert. An Tag 6 oder 7 wurde der Versuch beendet (Kapitel 2.2.2.3).

##### **2.2.2.2.1 Therapie-Ansatz**

Der Tlr2-Agonist PCSK wurde *per os (p.o.)* verabreicht, um die Wirkung der Tlr2-Aktivierung auf Chemotherapie-induzierte Mukositis zu überprüfen.

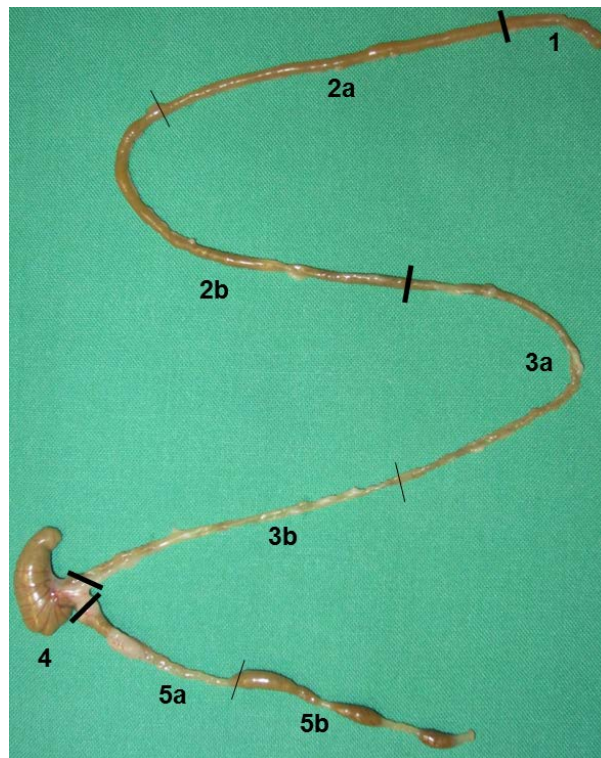
WT-Mäuse erhielten vor der MTX-Behandlung für fünf Tage die Breitbandantibiotika Vancomycin und Zienam<sup>®</sup> (je 50mg/kg Körpergewicht/Tag) [44] über das Trinkwasser (Tag -5 bis Tag -1). Es wurde gezeigt, dass bereits eine kurze Einnahme von Vancomycin und Zienam<sup>®</sup> zu einer reduzierten Konzentration und Diversität der Darm-Mikrobiota führt [114].

Sechs Stunden nach der Abx-Behandlung und einen Tag vor dem Start der MTX-Behandlung wurde den Mikrobiota-depletierten Mäusen PCSK in einer Konzentration von 150µg/ml (Tag -1 bis maximal Tag 5) über das Trinkwasser, das jeden zweiten Tag gewechselt wurde, verabreicht. An Tag 0 und Tag 1 wurde den Mäusen MTX (40mg/kg Körpergewicht) *i.p.* injiziert. Der klinische Allgemeinzustand, einschließlich Körpergewicht, wurde bis zur Organentnahme an Tag 7 täglich kontrolliert. Bei

einigen Untersuchungen fand die Organentnahme (Kapitel 2.2.2.3) bereits an Tag 3 statt.

### 2.2.2.3 Organentnahme und –präparation

Die Organentnahme erfolgte bei Mäusen, die durch Inhalationsanästhesie mit Isofluran schmerzfrei tiefbetäubt waren und danach sofort durch zervikale Dislokation getötet wurden. Die Organe, unter anderem der Darm (Abb. 2.1), wurden für Gefrierschnitte in *Tissue-Tek*<sup>®</sup> *O.C.T. Compound* eingebettet, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Darüber hinaus wurden Organstücke nach 24-stündiger Inkubation in *RNAlater*<sup>®</sup> bis zur Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation (Kapitel 2.2.3.2) bei -80°C eingefroren. Für den Bakteriennachweis wurden Organstücke gewogen und jeweils bei -80°C bis zur RNA-Isolation (Kapitel 2.2.2.6) gelagert.



**Abb. 2.1: Übersicht der Darmabschnitte einer Maus.**

Der Darm besteht aus Dün- und Dickdarm. Der Dünndarm setzt sich von proximal bis distal aus (1) Duodenum, (2a) proximalem Jejunum, (2b) distalem Jejunum, (3a) proximalem Ileum und (3b) terminalem Ileum zusammen. Die Unterteilung des Dickdarms erfolgt in (4) Caecum, (5a) proximalen Colon, (5b) distalen Colon und Rektum (nicht dargestellt).



Tabelle 2.3 zeigt die Lagerung der einzelnen Organe in einer Übersicht.

**Tabelle 2.3: Übersicht der einzelnen Organstücke und ihre Lagerung.**

Organ	Organgröße	Lagerung
Proximales Jejunum	4-6mm großes Stück 4-6mm großes Stück 10-12cm großes Stück	<i>Tissue-Tek® O.C.T. Compound</i> <i>RNAlater®</i> -80°C
Terminales Ileum	4-6mm großes Stück 4-6mm großes Stück 10-12cm großes Stück	<i>Tissue-Tek® O.C.T. Compound</i> <i>RNAlater®</i> -80°C
Distales Colon	4-6mm großes Stück 4-6mm großes Stück Restlicher Stuhl	<i>Tissue-Tek® O.C.T. Compound</i> <i>RNAlater®</i> -80°C
Caecum	Ganz	-80°C
Milz	Eine Hälfte Eine Hälfte	<i>Tissue-Tek® O.C.T. Compound</i> <i>RNAlater®</i>
Leber	Eine Hälfte Eine Hälfte	<i>Tissue-Tek® O.C.T. Compound</i> <i>RNAlater®</i>
Zunge	Ganz	<i>Tissue-Tek® O.C.T. Compound</i>

#### 2.2.2.4 Isolierung und Kultivierung von Cd11b<sup>+</sup>-Zellen aus Knochenmark

Tiefanästhesierte Mäuse (ca. fünf Wochen alt) wurden schmerzfrei durch zervikale Dislokation getötet. Die Hinterbeine der Mäuse wurden proximal abgetrennt und in Leibovitz L-15-Medium mit 10% FCS und 1% PS überführt. Die Knochen wurden zunächst freipräpariert und in Unter- und Oberschenkel getrennt. Anschließend wurde das Knochenmark mit einer Kanüle ausgespült, mit einer Pipette resuspendiert und die Zellsuspension durch ein 100µm-Zellsieb gefiltert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 500g und 4°C für 5min erfolgte die Erythrozytenlyse durch eine 5-minütige Behandlung mit Ammoniumchlorid-Lösung bei 4°C. Nachfolgend wurden die Zellen gewaschen und die Zellzahl per Neubauer-Zählkammer bestimmt (Kapitel 2.2.1.4). Die Zellen wurden in 1ml *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS)-Puffer (2% FCS in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS)) resuspendiert

und die Cd11b<sup>+</sup>-Population mit Hilfe des *EasySep™ Mouse CD11b Positive Selection*-Kits nach Herstellerangaben isoliert. Hierfür wurde den Zellen 50µl *CD11b-PE* zugegeben und bei RT im Dunkeln für 15min inkubiert. Nach Zugabe von 70µl *PE-Selection Cocktail* und einer weiteren Inkubation (RT, im Dunkeln, 15min) wurden die Zellen mit 50µl Nanopartikeln bei RT im Dunkeln für 10min behandelt. Die Zellen wurden dreimal für je 5min im Dunkeln in den *EasySep™*-Magneten gesetzt. Darauf folgte jeweils das Verwerfen des Überstands und das anschließende Aufnehmen der Zellen in 2,5ml FACS-Puffer. Anschließend wurden die Zellen in 15 bis 20ml Leibovitz L-15-Medium mit 10% FCS und 1% PS resuspendiert, mittels Neubauer-Zählkammer (Kapitel 2.2.1.4) gezählt und auf 6-Well- oder 12-Well-Poly-D-Lysin-Flachbodenplatten gleichmäßig ausplattiert. Die Cd11b<sup>+</sup>-Zellen wurden für 3h mit PCSK (20µg/ml) oder Wasser als Kontrolle behandelt, anschließend einmal mit Wachstumsmedium gewaschen und für 21h mit MTX (10µM) oder Natriumchlorid (NaCl) als Kontrolle inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet und Proteinlysate hergestellt (Kapitel 2.2.4.1). Die Kultivierung der Cd11b<sup>+</sup>-Zellen fand bei 37°C ohne CO<sub>2</sub>-Zugabe statt.

#### **2.2.2.5 Ex-vivo-Kultivierung von proximal-jejunalem Gewebe**

Für die *ex-vivo*-Kultivierung von proximal-jejunalem Gewebe wurden ca. neun Wochen alte Mäuse tiefanästhesiert und bei kompletter Schmerzfreiheit das Abdomen zügig geöffnet (Kapitel 2.2.2.3). Nach Entnahme des proximalen Jejunums wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation sofort getötet. Die Teilstücke des proximalen Jejunums wurden zweimal in 37°C-warmen PBS mit 10% FCS, 10µl/ml antibiotischer/antimykotischer (AB/AM)-Lösung und 50ng/ml Gentamicin gewaschen, invertiert und in gleich lange Stücke geschnitten. Diese wurden darauffolgend mit der luminalen Seite nach unten jeweils auf einem warmen Matrigel®-Zellkultureinsatz einer 6-Well-Flachbodenplatte eingebettet und für 30min bei 37°C entweder mit oder ohne PCSK (20µg/ml) in 500µl Medium pro Well behandelt. Anschließend wurde pro Well 1ml Leibovitz L-15-Medium mit 10% FCS, 10µl/ml AB/AM-Lösung und 50ng/ml Gentamicin dazugegeben und mit 10µM MTX oder mit NaCl als Negativkontrolle stimuliert. Die Proben wurden für 4h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden diese

in *Tissue-TEK*<sup>®</sup> *O.C.T.-Compound* eingebettet und bei -80°C eingefroren. Die Proben wurden nachfolgend auf Apoptose untersucht (Kapitel 2.2.2.10).

#### **2.2.2.6 Microarray-Analyse von proximal-jejunalem Gewebe**

Die RNA (Kapitel 2.2.3.2) aus dem proximalen Jejunum von ca. neun Wochen alten Mäusen (n=3 pro Behandlung) wurde per *Microarray*-Analyse durch *MFT Services* in Tübingen untersucht. Hierbei wurde der *GeneChip*<sup>®</sup> *Mouse Gene 1.1. ST-Array* verwendet. Die Hybridisierung, das Waschen, das Färben und das Scannen wurden maschinell am *GeneTitan*<sup>®</sup>-Instrument von Affymetrix, Santa Clara, CA, USA, durchgeführt. Anschließend wurden die Daten mittels RMA (*Robust Multichip Average*) normalisiert, um log<sub>2</sub>-transformierte Signalwerte zu erhalten, aus denen für die individuellen Subgruppen der Mittelwert gebildet wurde. Datensätze wurden bei niedriger Varianz zwischen den Proben ausgeschlossen. Anschließend wurden alle Daten in GEO (*Gene Expression Omnibus*; GSE56426) hinterlegt und entweder durch hierarchische Clusteranalyse und Auswertung als *Heatmap* mit Hilfe von ArrayStar-Software oder durch *Ingenuity*<sup>®</sup>-Pathway-Analyse (IPA) analysiert (Kapitel 2.2.2.6.1).

##### **2.2.2.6.1 Pathway-Analyse mittels Ingenuity<sup>®</sup>**

Alle Daten der *Microarray*-Analyse (Kapitel 2.2.2.6) wurden mittels IPA ([www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) weiter untersucht. *Ingenuity*<sup>®</sup> ermöglicht die Visualisierung der funktionellen Interaktionen der identifizierten Gene zu einem Netzwerk wie auch die Identifizierung spezieller Signalkaskaden, die mit den identifizierten Genen zusammenhängen.

Hierfür wurden die Gene, die mittels der *Microarray*-Analyse als signifikant verändert erkannt wurden, auf der Internetseite von *Ingenuity*<sup>®</sup> hochgeladen. IPA zog daraufhin Informationen der identifizierten Gene aus der *Ingenuity*<sup>®</sup> *Knowledge Base*, die aus einer Vielzahl von Veröffentlichungen besteht, heraus. Im Anschluss wurden die Informationen als Netzwerk graphisch dargestellt.

### 2.2.2.7 DNA-Isolierung Mäuse-Stuhl

Der Stuhl von ca. neun Wochen alten Mäusen wurde zur Isolierung von genomischer DNA zum Nachweis von Bakterien verwendet. Die DNA-Extraktion wurde mit Hilfe des *FastDNA™ SPIN Kit for Soil* entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

Kurz zusammengefasst wurde von jeder Stuhlprobe höchstens 500mg in das *Lysing Matrix E tube* überführt. Nach Zugabe von 978µl *Sodium Phosphate Buffer* und 122µl *MT Buffer* wurden die Proben im *FastPrep® FP120* bei einer Geschwindigkeit von 6,0 für 40s homogenisiert. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Proben bei 14.000g für 15min zentrifugiert und der Überstand in ein neues 2ml-Gefäß überführt. Im Anschluss wurden 250µl *PPS* auf die Proben pipettiert und das 2ml-Gefäß zehnmal per Hand invertiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (14.000g, 5min) wurde der Überstand in ein 15ml-Röhrchen transferiert. Die *Binding Matrix*-Suspension wurde resuspendiert und jeder Probe je 1ml zugeführt. Für 2min wurden die Röhrchen per Hand invertiert und für weitere 3min in einen Ständer gestellt. Nach Entfernen von 500µl des Überstandes wurde die Matrix in dem noch verbliebenen Überstand resuspendiert, 600µl der Mixtur in ein *SPIN™*-Filter überführt und bei 14.000g für 1min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, weitere 600µl der Mixtur wurden auf den *SPIN™*-Filter pipettiert und nochmals abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Das Pellet auf der Säule wurde mit Hilfe von 500µl *SEWS-M* resuspendiert und bei 14.000g für 1min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde ohne weitere Zugabe von Flüssigkeit die Probe erneut zentrifugiert (14.000g, 2min). Der *SPIN™*-Filter wurde auf ein 2ml-Reaktionsgefäß gesetzt und für 5min luftgetrocknet. Anschließend wurde die Matrix in 50 bis 100µl Desoxyribonuklease (DNase)/Pyrogen-freies Wasser (DES) resuspendiert und bei 55°C für 5min inkubiert. Die Probe wurde bei 14.000g für 1min zentrifugiert, der Filter verworfen und die isolierte DNA-Probe bis zum Bakteriennachweis bei -20°C gelagert.

Die Analyse der Bakterien im Stuhl wurde freundlicherweise von Dr. Alan W. Walker, PhD (*Rowett Institute of Nutrition and Health, University of Aberdeen*), und von Dr. Julian Parkhill, PhD, und Paul Scott (*Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge*) durchgeführt [52]. Für die PCR-Amplifikation wurden Primer verwendet, welche die V1-V2 Region der bakteriellen 16S rRNA umschließen. Die Sequenzierung erfolgte

per *Illumina MiSeq*. Nähere Informationen sind in der folgenden Publikation angegeben: [52]. Die Ergebnisse wurden mittels der OTU (*Operational Taxonomic Unit*)-Vielfalt und des Shannon-Vielfalt-Index-Scores ausgewertet. OTU wird im Rahmen dieser Arbeit definiert als eine 16S rDNA-Sequenzgruppe, in der die Sequenzen in den untersuchten Proben zu mindestens 97% identisch sind. Beim Shannon-Vielfalt-Index-Score wird zusätzlich die Abundanz der einzelnen OTU's berücksichtigt [215]. Das Dendrogramm gibt zusätzlich die phylogenetische Beziehung der einzelnen Mäuse zueinander wieder.

## **2.2.2.8 Histologie**

### **2.2.2.8.1 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Für histologische Untersuchungen wurden die in *Tissue-TEK® O.C.T.-Compound* eingebetteten Gewebestücke an einem *MICROM HM 560*-Kryostat geschnitten. Die 7µm dicken Gefrierschnitte wurden auf *Superfrost® Plus Gold*-Objektträger aufgenommen und bis zur weiteren Behandlung bei -20°C gelagert.

### **2.2.2.8.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung (H/E-Färbung)**

Die Hämatoxylin/Eosin-Färbung (H/E-Färbung) ist eine Standardfärbemethode, die es ermöglicht, verschiedene Gewebestrukturen zu unterscheiden. Das Hämatoxylin, ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum, färbt dabei Zellkerne blau. Der synthetische Farbstoff Eosin färbt aufgrund seiner sauren Eigenschaft alle basischen Strukturen, wie z.B. das Zytoplasma von Zellen, rot.

Für die H/E-Färbung wurde das *Fast Frozen Stain*-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Gefrierschnitte (Kapitel 2.2.2.8.1) wurden hierfür zunächst für 3min mit *Fast Fix* fixiert und einmal in destilliertem Wasser gewaschen, bevor sie für 4min in Hämatoxylin gefärbt wurden. Nach erneutem Waschen wurden die Objektträger viermal kurz im alkalischen *Bluing Reagent* eingetaucht. Anschließend wurden die Schnitte einmal gewaschen und für 20sek in Eosin inkubiert. Die Objektträger wurden danach zweimal in 95%igem und zweimal in 100%igem Ethanol für je 3min dehydriert. Nach einmaligem Eintauchen in Xylol-Ersatz und anschließender

Trocknung wurden die Objektträger mit *CitraMount™ Mounting-Medium* eingedeckelt. Die angefärbten Schnitte wurden am *Aperio ScanScope®*-System mit der Software *Console* dokumentiert und mit *ImageScope* visualisiert.

### 2.2.2.8.3 Histologie-Score

Der Histologie-Score von Gefrierschnitten des proximalen Jejunums, des terminalen Ileums und des distalen Colons wurde anhand der Kriterien in Tabelle 2.4 bestimmt.

**Tabelle 2.4: Kriterien des Histologie-Scores.**

Kriterien	Score	Definition
Becherzellen	0	Normale Anzahl
	1	Verlust der Becherzellen in kleinen Arealen (<50%)
	2	Verlust der Becherzellen in großen Arealen (≥50%)
Enterozyten	0	Normale Morphologie
	1	Abflachung des Epithels
	2	Kompletter Verlust des Epithels
	3	Mukosale Erosion / Ulzeration
Villi	0	Normale Morphologie
	1	Verkürzung der Villi um ≥25-50%
	2	Verkürzung der Villi um >50-75%
	3	Verkürzung der Villi um >75%
Krypten	0	Normale Morphologie
	1	Kryptenverlust um <50%
	2	Kryptenverlust um ≥50%
Infiltration	0	Normale Morphologie
	1	Lymphoepitheliale Infiltration
	2	Infiltrate in Lamina Propria
	3	Infiltrate in Submukosa

### **2.2.2.9 Immunfluoreszenz-Färbungen**

Immunfluoreszenz-Färbungen dienen der morphologischen Charakterisierung der Proteinexpression und der Lokalisation des Proteins in Geweben und Zellen. Die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung beruht auf der Bindung eines Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpers an den spezifischen Primärantikörper.

Bei der Auswertung der Immunfluoreszenz wurden für jeden Kanal die Multitrack-Option des Mikroskops und das sequentielle Scanning benutzt. Dies ermöglicht eine eventuelle Überlappung der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe und Kanäle rechnerisch auszugleichen und zu kompensieren. Eine Immunglobulin G (IgG)-Isotypenkontrolle diente der Einstellung der Intensität der Laser. Für alle Bilder einer Färbung wurden identische Laser- und standardisierte Mikroskopeinstellungen verwendet. Die Bilder wurden mit Hilfe der Software Zeiss *LSM 510 v.3.2* oder der Software Zeiss *Zen 2012 (blue edition)* aufgenommen und mit der Adobe *Photoshop CS4*-Software in standardisiertem Format gespeichert.

#### **2.2.2.9.1 Immunfluoreszenz-Färbungen von Gefrierschnitten**

Die Gefrierschnitte (Kapitel 2.2.2.8.1) vom proximalen Jejunum der verschiedenen Mäusegenotypen wurden entweder für 5 bis 10min auf Trockeneis mit Aceton oder für 10 bis 15min bei RT mit 3 bis 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert (Tabelle 2.5). In allen Schritten wurde PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  eingesetzt.

**Tabelle 2.5: Anwendung des Primärantikörpers bei indirekter Immunfluoreszenz-Färbung.**

Primär-antikörper	Fixierung	Blockierung	End-konzentration - Primär-antikörper	End-konzentration - Sekundär-antikörper	Primär-/ Sekundär-antikörper-Puffer
Cd4	5min, Aceton	10% NGS	1%	1%	1% NGS
Cd11b	5-10min, Aceton	10% NGS	2%	1%	1% NGS
Phospho- $\beta$ -Catenin	15min, 4% PFA	5% NGS + 0,3% Triton X-100	2%	1%	1% BSA + 0,3% Triton X-100
Phospho-Histon H2A.X	15min, 3% PFA	5% NGS + 0,3% Triton X-100	0,25%	1%	1% NGS + 0,3% Triton X-100
Phospho-Histon H3	15min, 3% PFA	5% NGS + 0,3% Triton X-100	0,1%	1%	1% NGS + 0,3% Triton X-100
Ttf3	15min, 4% PFA	10% NGS + 0,3% Triton X-100	2%	1%	1% BSA + 0,3% Triton X-100
P-gp	10min, Aceton	10% NGS	5 $\mu$ g/ml	1%	1% NGS

Nach Fixierung wurden die Objektträger dreimal für 5min in PBS gewaschen und die Proben anschließend mit *ImmEdge Pen* oder mit *Invignome's GnomePen* umrandet. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Schnitte, wie in Tabelle 2.5 jeweils beschrieben, für 1h bei RT mit Blockierungslösung inkubiert. Der Primärantikörper und die jeweilige IgG-Isotypenkontrolle wurden entsprechend den Angaben in Tabelle 2.5 verdünnt und über Nacht bei 4°C mit den Proben inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte dreimal für 5min in PBS gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper, wie ebenfalls in Tabelle 2.5 vermerkt, verdünnt und bei RT für 1h im Dunkeln auf den Objektträgern inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal für 5min in PBS gewaschen. Danach wurden sie entweder mit 0,3% *TO-PRO<sup>®</sup>-3 Iodide* (642661) in PBS für 15min bei RT inkubiert und nach dreimaligem 5-minütigem PBS-Waschen mit einem Tropfen des *VECTASHIELD<sup>®</sup>-Mounting-Mediums* oder sofort mit einem Tropfen des *VECTASHIELD<sup>®</sup>-Mounting-Mediums* mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) bzw. mit Propidiumiodid (PI) eingedeckelt. Die Objektträger wurden mit Nagellack versiegelt und am Laser-Scanning-Mikroskop *Axiovert 100M LSM 510* (konfokale Beleuchtung) oder am Lichtmikroskop *AxioObserver.Z1* mit *ApoTome* (strukturierte Beleuchtung) ausgewertet.



#### 2.2.2.9.2 Immunfluoreszenz-Färbungen von murinen Peritonealmakrophagen

Die Immunfluoreszenz-Färbung von murinen Peritonealmakrophagen wurde technisch gruppenintern freundlicherweise von Dr. rer. nat. Birgit Ey durchgeführt. Hierbei wurden  $0,5 \times 10^6$  Peritonealmakrophagen (Kapitel 2.2.2.11) auf 4-Well-Poly-D-Lysine-*Culture Slides* ausplattiert und mit oder ohne  $2,5 \times 10^6$  grün-fluoreszierendes Protein (eGFP)-exprimierenden *E. coli* in einem Gesamtvolumen von 1ml bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 90min behandelt. Die eGFP-exprimierenden *E. coli* wurden freundlicherweise von Dr. Cathryn Nagler (University of Chicago, USA) zur Verfügung gestellt [44]. Nach der Inkubation wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 100%igem Aceton bei -20°C für 5min fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit PBS, das mit 5% NGS (normales Ziegenserum) und 0,3% Triton X-100 versetzt war, bei RT für 60min geblockt. Die Probe wurde mit 2% Primärantikörper Cd11b (in 1% NGS und 0,3% Triton X-100 in PBS) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, bevor der 1%ige Sekundärantikörper Alexa Fluor® 647 Anti-Ratte (in 1% NGS und 0,3% Triton X-100 in PBS) auf den Zellen bei RT für 1h abgedunkelt mit der Probe inkubiert wurde. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen, die Kammern der *Culture Slides* vorsichtig entfernt und die Objektträger mit einem Tropfen des VECTASHIELD®-Mounting-Mediums mit DAPI eingedeckelt. Anschließend wurden diese mit Nagellack versiegelt. Die Auswertung erfolgte am Laser-Scanning-Mikroskop Axiovert 100M LSM 510 (konfokale Beleuchtung).

#### 2.2.2.10 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling-Assay (TUNEL-Assay)

Der Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling-Assay (TUNEL-Assay) ermöglicht die Darstellung der Zellkerne von apoptotischen Zellen. Bei der Apoptose kommt es zur Fragmentierung des DNA-Stranges, wodurch am Bruchende Hydroxygruppen frei werden, an die das Enzym Terminal Deoxynucleotidyl Transferase fluoreszierende Nukleotide bindet. Hierdurch wird die Dokumentation apoptotischer Zellen mikroskopisch möglich.

Der TUNEL-Assay wurde mit Hilfe des *In Situ Cell Death Detection*-Kits (Fluorescein oder *TMR red*) nach Herstellerangaben durchgeführt. Peritonealmakrophagen (Kapitel 2.2.2.11) von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen wurden auf Apoptose untersucht. Hierfür wurden zunächst  $0,5 \times 10^6$  Peritonealmakrophagen auf 4-Well-Poly-D-Lysine-*Culture Slides* ausplattiert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 3h inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium verworfen und die Peritonealmakrophagen mit oder ohne  $2,5 \times 10^6$  eGFP-exprimierenden *E. coli* in 500µl Wachstumsmedium behandelt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 90min. Das Medium wurde verworfen und die Zellen mit 1ml 4%igem PFA in Wasser bei RT und im Dunkeln für 1h fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Wasser mit 0,1% Triton X-100 und 0,1% Natriumcitrat für 4min bei 4°C permeabilisiert. Die Proben wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 50µl der TUNEL *reaction mixture* bzw. 50µl der *Label solution* als Negativkontrolle bei 37°C und im Dunkeln für 60min behandelt. Die Objektträger wurden danach dreimal mit PBS gewaschen und mit einem Tropfen des VECTASHIELD®-Mounting-Mediums mit DAPI eingedeckelt.

Die Gefrierschnitte (Kapitel 2.2.2.8.1) von *ex-vivo*-kultiviertem Dünndarm von WT- und MDR1A KO-Mäusen (Kapitel 2.2.2.5) wurden ebenfalls auf Apoptose untersucht. Hierfür wurden die Proben mit PBS gewaschen und in Wasser mit 0,1% Triton X-100 und 0,1% Natriumcitrat für 2min bei 4°C permeabilisiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen, wie bereits oben bei den Peritonealmakrophagen beschrieben, mit der TUNEL *reaction mixture* behandelt, gewaschen und mit einem Tropfen des VECTASHIELD®-Mounting-Mediums mit PI eingedeckelt.

Anschließend wurden die Objektträger mit Nagellack versiegelt und am Lichtmikroskop AxioObserver.Z1 mit ApoTome dokumentiert. Die apoptotischen Zellen (TUNEL<sup>+</sup>-Zellen) wurden ausgewertet, indem diese bei einer 40x-Vergrößerung in mindestens zehn zufällig ausgewählten Sichtfeldern mittels *ImageJ* ausgezählt und in Relation zu allen PI<sup>+</sup>-Zellen gesetzt wurden.

#### 2.2.2.11 Isolation von Peritonealmakrophagen

Peritonealmakrophagen von fünf bis sechs Wochen alten TLR2 KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen wurden mittels Peritoneal-Lavage im Makrophagen-Wachstumsmedium mit 1% PS isoliert. Die Zellen wurden bei 500g und 4°C für 5min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Erythrozyten wurden durch Ammoniumchlorid-Behandlung auf Eis für 3min lysiert. Die Peritonealmakrophagen wurden anschließend zweimal mit dem Wachstumsmedium gewaschen und mittels Trypanblaufärbung vital gezählt (Kapitel 2.2.1.4).

#### 2.2.2.12 Caspase-1-Apoptose-Assay

Lebende murine Peritonealmakrophagen wurden auf die Caspase-1 (Casp1)-Aktivität mittels *Prizm™ Caspase-1 Apoptosis Assay*-Kit untersucht. Hierfür wurden diese auf 4-Well-Poly-D-Lysine-Culture Slides in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/Well ausplattiert. Danach wurden sie bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 3h bis zur Adhärenz inkubiert. Anschließend wurde das Medium verworfen und die Peritonealmakrophagen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 90min mit  $2,5 \times 10^6$  eGFP-exprimierenden *E. coli* [8]/500µl Wachstumsmedium behandelt. Als Negativkontrolle wurde das Wachstumsmedium ohne Zugabe von *E. coli* verwendet. Nach der Inkubation wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 200µl des Casp1-Substrates bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 45min behandelt. Hier wurde das Wachstumsmedium erneut als Negativkontrolle eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Wachstumsmedium gewaschen und mit 1µg/ml des Fluoreszenz-Farbstoffes Hoechst 33342 für 10min bei RT behandelt. Nach einmaligem Waschen mit Wachstumsmedium und einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit *VECTASHIELD®-Mounting-Medium* eingedeckelt und sofort am Laser-Scanning-Mikroskop *Axiovert 100M LSM 510* (konfokale Beleuchtung) ausgewertet. Für jeden Kanal wurden die Multitrack-Option des Mikroskops und das sequentielle Scanning verwendet. Die Bilder wurden mit der Software Zeiss *LSM 510 v.3.2* aufgenommen und mit der Adobe *Photoshop CS4*-Software gespeichert.

### 2.2.2.13 Nachweis der Myeloperoxidase-Aktivität (MPO-ELISA)

MPO ist ein Glycoprotein, das in allen Zellen der myeloischen Reihe exprimiert wird [149]. Es hat während der Phagozytose von Fremdpartikeln eine wichtige Funktion als Enzym, da es Hypochloridionen produziert, die verschiedene Biomoleküle oxidieren. MPO wird als Marker für oxidativen Stress eingesetzt.

Das proximale Jejunum von unbehandelten und MTX-behandelten WT- und TLR2 KO-Mäusen wurde auf seine MPO-Konzentration untersucht. Hierfür wurde der *Mouse MPO-ELISA* verwendet. Das Protokoll wurde mit kleineren Änderungen nach Herstellerangaben durchgeführt. Zusammengefasst wurden 2 bis 15mg des proximalen Jejunums, das in RNAlater gelagert war, dreimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben in 100µl eiskaltem Lysepuffer mit 10% Glyzerin, 200mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7,4), 5mM EDTA, versetzt mit *cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail* und *PhosSTOP Phosphatase* und 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), aufgenommen. Die Proben wurden mit Hilfe der Schwingmühle Retsch *MM301* zerkleinert und zweimal bei 1500g und 4°C für 15min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Vor Beginn des ELISAs wurden die Proben auf ihre Proteinkonzentration mit Hilfe des *Bradford-Assay* untersucht (Kapitel 2.2.4.2), 15µl jeder Probe in je 285µl *Dilution Buffer* verdünnt und auf RT gebracht. Jede Probe lief als Duplikat. Nach Ansetzen aller Reagenzien wurden jeweils 100µl des Standards, der Proben und der Kontrollen in die Wells der vorbereiteten 96-Well-Flachbodenplatte ohne Luftblasen pipettiert und für 1h bei RT inkubiert. Die Wells wurden viermal mit Waschpuffer gewaschen, bevor 100µl *Tracer* in jedes einzelne Well hinzugefügt wurde. Nach einer weiteren Inkubation (RT, 1h) und vierfachem Waschen wurde in jedes Well 100µl Streptavidin-Peroxidase pipettiert und bei RT für 1h inkubiert. Die Wells wurden erneut viermal gewaschen und mit 100µl *TMB*-Substrat versehen. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei RT für 30min. Die Reaktion wurde mit 100µl *Stop Solution* abgestoppt, die Platte vorsichtig geschüttelt und bei 450nm mit einer Referenzwellenlänge von 570nm am ELISA-Reader *ELx808* gemessen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Proben bestimmt und die Menge an MPO pro Gramm des eingesetzten Gewebes berechnet.

### 2.2.3 Genexpressionsanalyse

#### 2.2.3.1 Aufnahme von Zellen oder Gewebe in TRI-Reagenz

Für die RNA-Isolation (Kapitel 2.2.3.2) wurden geerntete Zellen in 1ml *TRI-Reagent*<sup>®</sup> resuspendiert, für 10min bei RT inkubiert und bis zur Isolation bei -80°C eingefroren. Das *TRI-Reagent*<sup>®</sup> enthält Guanidin-Thiozyanat, welches Zellen lysiert und Ribonukleasen (RNasen) inaktiviert, und saures Phenol, das RNA von DNA und Proteinen trennt. Murine Gewebestücke wurden zunächst einen Tag lang in *RNAlater*<sup>®</sup> inkubiert und bei -80°C eingefroren. Danach wurden sie in 1ml *TRI-Reagent*<sup>®</sup> aufgenommen, ebenfalls für 10min bei RT inkubiert und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.3.2 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation und die anschließende qRT-PCR (Kapitel 2.2.3.3) dienen der Analyse der Transkriptionsaktivität einer Zelle oder eines Gewebestückes. Hierbei ist die Inaktivierung der stabilen RNasen wichtig, um die Degradierung der RNA zu verhindern.

Für die Isolierung der RNA wurde das *RiboPure*<sup>™</sup>-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Zugabe von 1-Bromo-3-Chloropropan (BCP) ermöglicht die Phasentrennung von RNA und anderen Zellbestandteilen. Hierfür wurde den Proben je 100µl BCP zugegeben, die Proben gevortexet und für 10min bei RT inkubiert. Ein Zentrifugationsschritt bei 12.000g und 4°C für 10min diente der Phasentrennung. Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß pipettiert und die RNA durch Zugabe von 200µl Ethanol präzipitiert. Diese wurde auf Glasfaser-Säulen des *RiboPure*<sup>™</sup>-Kits gegeben und bei 12.000g und RT für 30sek zentrifugiert. Nach zweifachem Waschen mit dem Waschpuffer (12.000g, RT, 30sek) wurde die RNA mit 100µl *Elution Buffer* eluiert. Anschließend wurden die Säulen erneut bei 12.000g und RT für 1min zentrifugiert und die RNA mit dem *RNeasy Mini*-Kit aufgereinigt. Hierfür wurde 350µl *RLT*-Puffer mit 1%igem β-Mercaptoethanol pro Probe hinzugegeben. Nach dem Transferieren der Proben auf Säulen mit Silikon-Gel-Membranen wurden die Proben zentrifugiert (10.000g, RT, 30sek) und mit dem *RW1*-Puffer gewaschen. Danach wurden die Proben mit einem Gemisch aus DNase und *RDD*-Puffer bei RT

für 15min behandelt, um DNA-Kontaminationen zu vermeiden. Anschließend wurden die Proben einmal mit *RW1*-Puffer (10.000g, RT, 30sek) und zweimal mit *RPE*-Puffer gewaschen. Die Eluation erfolgte mit Hilfe von 50µl RNase-freiem Wasser und darauffolgender Zentrifugation bei 10.000g und RT für 1min.

Die RNA-Konzentration und -Reinheit wurde photometrisch bei 260nm, 280nm und 320nm gemessen.

### **2.2.3.3 Quantitative *Realtime* Reverse-Transkriptions-PCR (qRT-PCR)**

Die Genexpression wurde mittels der isolierten RNA anhand der quantitativen *Realtime* Reverse-Transkriptions-PCR (qRT-PCR) untersucht. Im Gegensatz zur PCR (Kapitel 2.2.2.1.2) werden hier die Nukleinsäuren durch Interkalation von *SYBR-Green* quantifiziert. Zudem wird ein RNA-Strang mit Hilfe der Reversen Transkriptase in einen komplementären DNA (cDNA)-Strang umgeschrieben, der anschließend synthetisiert wird. Das Einsetzen bestimmter Primer, welche auf das zu untersuchende Gen abgestimmt werden, ermöglicht die Amplifizierung der cDNA. Hierbei wird die Fluoreszenz des interkalierenden *SYBR-Green* im neusynthetisierten Strang in Echtzeit (*Real-Time*) gemessen. Je höher die Menge des PCR-Produktes steigt, desto stärker ist die Fluoreszenzintensität. Der CT-Wert (*Cycle Threshold*-Wert) gibt die Zykluszahl an, bei der die Fluoreszenz einen festgelegten Wert übersteigt. Ein kleiner CT-Wert bedeutet eine große Menge an cDNA. Die Schmelzkurve der amplifizierten Stränge ermöglicht am Ende des PCR-Programmes die Differenzierung zwischen PCR-Produkt und unerwünschten Primer-Dimeren. Für die qRT-PCR wurde das *One Step QuantiFast SYBR Green RT-PCR*-Kit auf dem *Realplex<sup>2</sup> Mastercycler<sup>®</sup>* benutzt. Für jeden Ansatz wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

---

<i>QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix (2x)</i>	7,5µl
RT-Mix	0,1µl
RNase-freies Wasser	3,9µl
<i>QuantiTect Primer Assay</i>	1,5µl
RNA	2,0µl

Die qRT-PCR wurde mit dem *Realplex*-Programm ausgewertet. Die Kopienzahl der einzelnen Transkripte wurde berechnet, indem ihre relative Konzentration auf das *housekeeping*-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) bezogen wird (Kopienzahl / Kopienzahl GAPDH x 100.000).

## 2.2.4 Proteinexpressionsanalyse

### 2.2.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Für das Herstellen von Proteinlysaten wurden Suspensionszellen auf- und abpipettiert und vorsichtig mit einem Zellschaber behandelt, um vermeintliche adhärenente Zellen mitaufzunehmen. THP-1-Zellen wurden bei 800g und RT, Cd11b<sup>+</sup>-Zellen bei 500g und RT für 5min zentrifugiert, in kaltem PBS mit 100µM Natriumorthovanadat (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) auf Eis gewaschen und das PBS gründlich entfernt. Anschließend wurden die Zellen in 120 bis 400µl Lysepuffer V aufgenommen, welches mit *PhosSTOP Phosphatase*, *cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail* und 1mM PMSF versetzt war. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 14.000g und 4°C für 20min zentrifugiert und der Überstand als totales Zelllysate in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Lysat bei -80°C eingefroren.

### 2.2.4.2 Proteinbestimmung nach *Bradford*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate wurde mit Hilfe der *Bradford*-Methode durchgeführt [14]. Hierfür wurden 800µl Wasser in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß vorgelegt, 200µl *Bio-Rad Protein-Assay* dazugegeben und gründlich gemischt. Nach Zugabe von 1 bis 10µl Proteinlysate, je nach erwarteter

Proteinkonzentration, wurde die Absorption der Probe in einer Plastikküvette bei 595nm am Photometer gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer zuvor erstellten Standardkurve direkt berechnet.

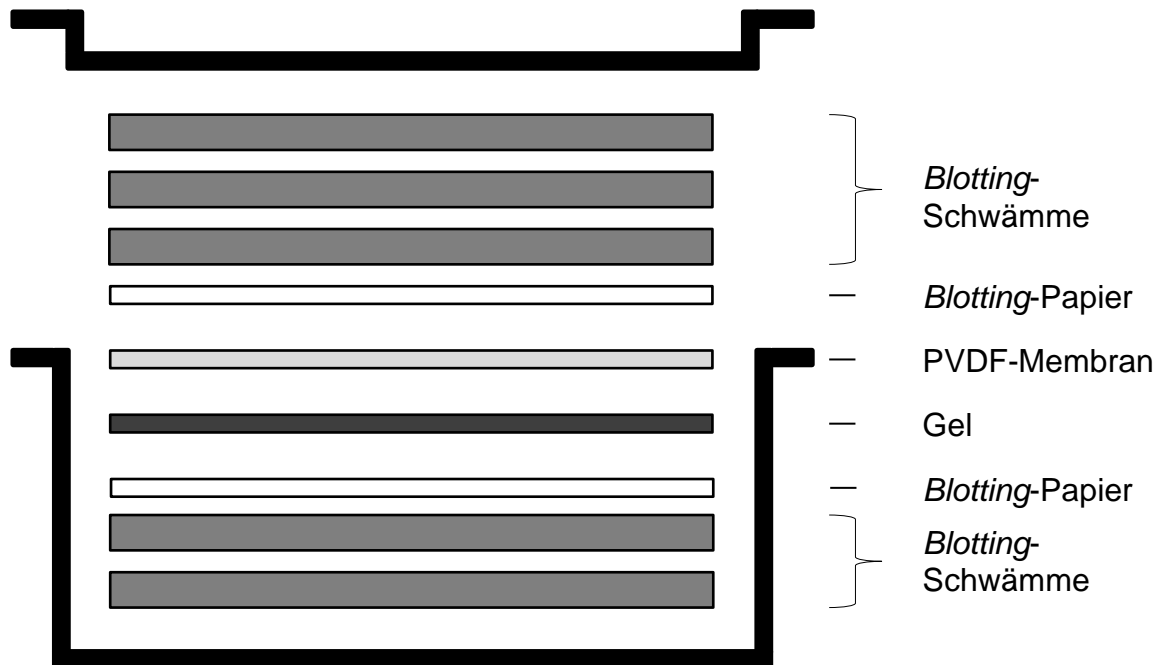
#### **2.2.4.3 Western-Blot-Analyse**

Die Western-Blot-Analyse ist eine Methode zur Identifizierung einzelner Proteine eines Proteingemisches. Das Proteingemisch wird zunächst mit Hilfe der *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS)-Gelelektrophorese nach Größe und Ladung in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Hierfür werden Gele verwendet, die aus einem Sammel- und einem Trenngel bestehen. Das Sammelgel dient der gleichmäßigen Anordnung der Proteine, während das Trenngel zur Auftrennung der Proteine nach Größe führt. Aufgrund der Kleinporigkeit des Trenngels wandern bei angelegter Spannung kleinere Proteinmoleküle schneller durch das Gel als größere. Nach Auftrennung der Proteine werden diese mittels *Blotting* aus dem Gel auf eine Membran transferiert. Die unspezifischen Bindungsstellen werden blockiert und die Membran anschließend mit dem gewünschten Antikörper behandelt. Ein Sekundärantikörper ermöglicht aufgrund seiner Bindung an ein Enzym den Nachweis der Bindung des Primärantikörpers.

Die Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Lysate wurden zunächst angeglichen. Für ein 10-Well-4-12% *Bis-Tris SDS Page*-Gel wurden 30µl Protein angesetzt und mit 10µl *LDS Sample*-Puffer und 4µl 1M Dithiothreitol (DTT) versetzt. Die Proben wurden bei 85°C für 2min erhitzt, um Tertiärstrukturen und Disulfidbrücken zu denaturieren. Nach kurzer Abkühlung im Eis wurden die Proben auf das Gel geladen. Als Größenstandards wurden je 6µl *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained*-Standard und *MagicMark™ XP* verwendet. Das Gel wurde in 1x MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)-Laufpuffer bei 160V zwischen 60 und 75min im *X-cell SureLock™ Mini-Cell*-System laufengelassen. Fünf *Blotting*-Schwämme und zwei *Blotting*-Papierstücke wurden währenddessen in 1x Transferpuffer eingeweicht. Eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde erst für 5min in Methanol, dann ebenfalls in 1x Transferpuffer gegeben.



Nach der Proteinauftrennung erfolgte der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran durch *Blotting* bei 30V für 80min mit dem *X-cell II™ Blot-Module*. Hierfür wurde das Gel in die *Blotting*-Apparatur, wie in Abb. 2.2 dargestellt, eingebracht.



**Abb. 2.2: Aufbau der X-cell II™ Blot-Module-Blotting-Apparatur.**

Für die *Blotting*-Apparatur werden zwei in Transferpuffer-eingeweichte *Blotting*-Schwämme auf den Boden des *X-cell II™ Blot-Modules* gelegt. Auf diese folgen ein *Blotting*-Papier, das zu transferierende Gel und die PVDF-Membran. Anschließend werden ein weiteres *Blotting*-Papier und drei weitere *Blotting*-Schwämme darauf gegeben.

Die *Blotting*-Apparatur wurde mit 1x Transferpuffer befüllt, die äußere Kammer zur Abkühlung mit Wasser. Nach dem Transfer wurde das Gel über Nacht in *SimplyBlue™* inkubiert (Kapitel 2.2.4.4). Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde die Membran entweder mit 25ml Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween-20 (TBST) oder Phosphat-gepufferter Salzlösung mit Tween-20 (PBST) mit 5% Magermilch für 60min bei RT auf einem Schüttler behandelt (Tabelle 2.6). Anschließend wurde die Membran dreimal für je 5min mit TBST bzw. PBST gewaschen und dann mit dem Primärantikörper in 2ml Puffer entsprechend der in Tabelle 2.6 aufgelisteten Verdünnung in einem 50ml-Röhrchen auf einem Rollmischer bei 4°C über Nacht inkubiert.

**Tabelle 2.6: Blockierungspuffer und Verdünnung der Primärantikörper.**

<b>Primär-antikörper</b>	<b>Blockierung</b>	<b>Endkonzentration - Primärantikörper</b>	<b>Primär-antikörper-Puffer</b>	<b>Sekundär-antikörper-Puffer</b>
$\beta$ -Aktin	5% Milch/TBST	0,1%	5% Milch/TBST	5% Milch/TBST
Phospho-MKK3/MKK6	5% Milch/TBST	0,4%	5% BSA/TBST	5% Milch/TBST
MKP1	5% Milch/TBST	1% bis 0,4%	5% BSA/TBST	5% Milch/TBST
P38-MAPK	5% Milch/TBST	0,2%	5% BSA/TBST	5% Milch/TBST
Phospho-P38-MAPK	5% Milch/TBST	0,1%	5% BSA/TBST	5% Milch/TBST
Cleaved-PARP	5% Milch/TBST	1% bis 0,1%	5% Milch/TBST	5% Milch/TBST
P-GP	5% Milch/PBST	10%	5% Milch/PBST	5% Milch/PBST

Am nächsten Tag wurde zunächst der ungebundene Erstantikörper in drei 5-minütigen Waschschritten mit TBST oder PBST abgewaschen und die Membran anschließend mit dem Sekundärantikörper bei RT für 60min auf einem Schüttler inkubiert. Hierfür wurde 3 $\mu$ l eines speziegerichteten, Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpers in 25ml Sekundärantikörper-Puffer gegeben (Tabelle 2.6). Dann wurde die Membran dreimal für 5min in TBST oder PBST gewaschen und mit *Blotting*-Papier abgetrocknet. Die Chemilumineszenz (ECL)-Reagenzien, die durch HRP umgesetzt werden, wurden vermischt und die Membran mit diesen für 1min unter ständigem Schwenken behandelt. Die Membran wurde danach trocken in eine Röntgenkassette eingelegt. Im Dunkeln wurden Röntgenfilme für bis zu 20min auf die Membran in der Kassette gelegt. Anschließend wurde der Röntgenfilm für ca. 1min in Röntgenentwickler-Lösung eingetaucht, einmal in Wasser gewaschen und für mindestens 3min in Röntgenfixier-Lösung gegeben. Danach wurde der Röntgenfilm für mindestens 7min unter fließendes Wasser gehalten und bei 37°C in einem Wärmeschränk getrocknet. Mit Hilfe der verwendeten Größenstandards wurden die Banden ausgewertet. Die Filme wurden mit dem *EPSON Perfection V750 PRO*-Scanner digitalisiert.

#### 2.2.4.4 Anfärben des Western-Blot-Gels mit *SimplyBlue*<sup>TM</sup>

*SimplyBlue*<sup>TM</sup> färbt im Gel verbliebene Proteine, sodass die Überprüfung der gleichmäßigen Beladung des Gels wie auch der erfolgreichen Proteinauftrennung ermöglicht wird.

Die Western-Blot-Gele wurden nach dem *Blotting* mit *SimplyBlue*<sup>TM</sup> für mehrere Stunden bei RT auf dem Schüttler gefärbt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

#### 2.2.4.5 *Reproben* und *Strippen* des Western-Blots

Eine Membran kann mehrere Proteine nacheinander nachweisen. Dies ist entweder über *Reproben* möglich oder über das *Strippen* der Membran. Beim *Reproben* wird die Membran dreimal für 5min mit TBST oder PBST gewaschen und mit einem weiteren Primärantikörper einer anderen Spezies, wie in Kapitel 2.2.4.3 beschrieben, behandelt.

Das *Strippen* ermöglicht es, die Membran auch auf Primärantikörper der gleichen Spezies zu untersuchen. Nach Abwaschen des Rest-ECL mit PBST oder TBST wurde der Primär-Sekundärantikörper-Komplex mittels *Stripping*-Puffer entfernt. Der *Stripping*-Puffer besteht aus 10ml 10% SDS-Lösung, 3,125ml Tris-HCl (pH 6,8), 300µl β-Mercaptoethanol und 36,575ml Wasser. Die Membran wurde bei 55°C für 30min in *Stripping*-Puffer unter Schütteln inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBST oder PBST wurde die Membran mit einem anderen Primärantikörper behandelt, wie in Kapitel 2.2.4.3 beschrieben.

#### 2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht, eine Vielzahl an Zellen gleichzeitig hinsichtlich ihrer Eigenschaften zu untersuchen. Die Zellen werden durch ein Durchflusszytometer als Einzelzellsuspension aufgenommen und passieren einen Laserstrahl. Durch die Streuung des Lichtes werden Größe und Granularität der Zellen bestimmt. Das Vorwärtstreulicht (*Forward-Scatter*, FSC) gibt Auskunft über die Größe der Zelle, das Seitwärtstreulicht (*Side-Scatter*, SSC) hingegen über die

Granularität. Zudem erlaubt die Durchflusszytometrie die Messung von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen. Hierfür werden fluoreszierende Antikörper verwendet, die spezifisch an zelluläre Antigene binden. Die Fluoreszenzintensität wurde mit der entsprechenden Software ausgewertet. Die Zellen werden in einem Koordinatensystem, dem sogenannten *Dot-Blot*, als einzelne Punkte oder im Histogramm als Häufigkeitsverteilung dargestellt. Eine detailliertere Darstellung einzelner Subpopulationen wird durch das Setzen von *Gates* ermöglicht, bei denen die nicht im *Gate*-liegenden Zellen vernachlässigt werden.

Die gefärbten Zellen wurden an einem BD *FACSCanto™ II* mit BD *FACSDiva™*-Software gemessen und mit der *FlowJo*-Software ausgewertet. Die Kompensation erfolgte mit Hilfe von Kompensationsbeads, um mögliche Überlappungen der Spektrenbereiche zu unterbinden. FSC und SSC wurden so eingestellt, dass möglichst alle Zellen im *Dot-Blot* lagen. Tote Zellen wurden entweder mit Hilfe von *Fixable Viability*-Farbstoffen und/oder durch das Setzen von *Gates* mittels FSC/SSC bei der Auswertung ausgeschlossen.

#### **2.2.5.1 Prinzip der extrazellulären Färbung für Durchflusszytometrie**

Für die extrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie wurden  $1 \times 10^6$  THP-1-Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und einmal in FACS-Puffer gewaschen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 500g und 4°C für 5min wurde der Überstand abgekippt, die Zellen in 1ml PBS aufgenommen und mit 1µl *Fixable Viability*-Farbstoff bei 4°C im Dunkeln für 30min behandelt. Der *Fixable Viability*-Farbstoff färbte tote Zellen stark ein, sodass diese von den lebenden Zellen bei der Auswertung getrennt werden konnten. Nach erneuter Zentrifugation (500g, 4°C, 5min) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in je 100µl Fc-Block aufgenommen. Der 20%ige Fc-Block (in FACS-Puffer) blockierte unspezifische Bindungsstellen. Nach einer Inkubation bei 4°C im Dunkeln von 15min wurden die Zellen mit den spezifischen Antikörpern bei 4°C im Dunkeln für weitere 30min behandelt. Die Zellen wurden einmal mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 500µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Messung der Zellen fand direkt im Anschluss am Durchflusszytometer (Kapitel 2.2.5) statt.

### 2.2.5.2 Nachweis der P-GP-Efflux-Aktivität (*Multidrug Resistance Direct Dye Efflux-Assay*)

Der *Multidrug Resistance Direct Dye Efflux-Assay* dient der Untersuchung der ABCB1/MDR1-Pumpe. Der ABC-Transporter P-GP ist für seine Resistenz gegenüber verschiedener Chemotherapeutika bekannt [58]. Mit Hilfe des Assays und der darin enthaltenen fluoreszierenden P-GP-Substraten Rhodamine 123 und 3,3-Diethyloxacarbocyanine (DiOC<sub>2</sub>(3)) [24] kann die Aktivität des ABCB1/MDR1 in lebenden Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Die Efflux-Aktivität des ABC-Transporters ist sehr temperaturabhängig: Während das ABCB1/MDR1-kodierte P-GP bei 4°C inaktiv ist, erreicht es bei 37°C seine optimale Funktion.

Für die vorliegende Arbeit wurden THP-1- und Caco-2-Zellen für 5min oder 24h mit 20µg/ml PCSK behandelt und auf die Efflux-Aktivität von MDR1 nach Herstellerangaben mit einzelnen Veränderungen untersucht. Hierfür wurden 1x10<sup>6</sup> Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 200g und RT für 5min abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 1ml PBS resuspendiert und mit 1µl *Fixable Viability*-Farbstoff bei 4°C im Dunkeln für 30min behandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut zentrifugiert (200g, RT, 5min) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden auf Eis im Dunkeln entweder mit 1ml Rhodamine 123 für 1h oder mit 1ml DiOC<sub>2</sub>(3) für 15min behandelt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Effluxpuffer gewaschen. Die Zellsuspension wurde in zwei Röhrchen aufgeteilt, um den Efflux bei 37°C und bei 4°C zu untersuchen. Hierfür wurde in jedes Röhrchen 2,5x10<sup>5</sup> Zellen überführt, bei 200g und RT für 5min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Proben, die auf ihren Efflux bei 37°C untersucht wurden, wurden im 1ml warmen Effluxpuffer resuspendiert, während die Zellen, deren Efflux bei 4°C analysiert wurde, in 1ml kaltem Effluxpuffer aufgenommen wurden. Die Zellen wurden entweder bei 37°C oder auf Eis für 1h inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Allen Röhrchen wurde nach der Inkubation sofort 3ml kalter Effluxpuffer hinzugefügt. Nach Zentrifugation bei 200g und 4°C für 5min wurden die Zellen einmal mit kaltem Effluxpuffer gewaschen, bevor sie in 500µl kalten Effluxpuffer aufgenommen wurden. Die Analyse mittels Durchflusszytometer (Kapitel 2.2.5) erfolgte im Anschluss.

### 2.2.5.3 Nachweis des durch P-GP vermittelten MTX-Efflux

Der Efflux von MTX durch P-GP wurde mit Hilfe von PCSK und fluoreszierendem MTX (FL-MTX) am Durchflusszytometer ermittelt. Die P-GP-Aktivität ist von der Temperatur abhängig. Bei 4°C ist der ABC-Transporter aktiv und bei 37°C funktioniert er optimal.

Hierfür wurden THP-1-Zellen zunächst mit 10µM FL-MTX für 21h behandelt, bevor sie nach einmaligem Waschen mit 20µg/ml PCSK für 3h behandelt wurden. Um zu beweisen, dass der FL-MTX-Efflux durch P-GP vermittelt wird, wurde zudem der spezifische P-GP-Inhibitor C-4 eingesetzt. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 10µM Inhibitor oder seiner Negativkontrolle DMSO für 15min und für weitere 5min zusätzlich mit 20µg/ml PCSK behandelt. Die Zellen wurden mit dem Zellkulturmedium gewaschen und mit 10µM FL-MTX für 21h behandelt. Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 200g und RT für 5min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1µl *Fixable Viability*-Farbstoff in 1ml PBS bei 4°C im Dunkeln für 30min behandelt. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (200g, RT, 5min) und der Überstand verworfen. Nachdem die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen wurden, wurden diese auf zwei FACS-Röhrchen aufgeteilt. In jedes Röhrchen wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen überführt, einmal abzentrifugiert und in 1ml 37°C-warmem oder 4°C-kaltem FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden dann bei 37°C oder auf Eis für 1h inkubiert. Auf dieser Weise wurde der unterschiedliche Efflux für 1h bei 37°C und 4°C untersucht. Nach der Inkubation wurden alle Röhrchen auf Eis gestellt und mit 3ml kaltem FACS-Puffer befüllt. Die Zellen wurden bei 200g und 4°C für 5min zentrifugiert und einmal mit kaltem FACS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 500µl FACS-Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer (Kapitel 2.2.5) analysiert.

## 2.2.6 Funktionelle Assays

### 2.2.6.1 Aktivität des TLR2-Signalweges (SEAP-Assay)

SEAP ist ein Reportergen, welches in dieser Arbeit zur Untersuchung der TLR-Aktivität in THP-1-XBlue™-MD-2-CD14-Zellen (Kapitel 2.2.1.1) eingesetzt wird. Es ist eine abgeänderte Form der humanen plazentalen alkalischen Phosphatase und wird in den Zellkulturüberstand sekretiert. Das SEAP-Reportergen wird durch einen Promotor, der durch die beiden Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 induziert wird, kontrolliert. Durch TLR-Stimulation aktivieren THP-1-XBlue™-MD-2-CD14-Zellen Transkriptionsfaktoren und nachfolgend die Sekretion von SEAP. Die SEAP-Aktivität wird durch *QUANTI-Blue*™ detektiert, indem es bei Anwesenheit von SEAP das Medium von pink zu violett/blau färbt.

Für den SEAP-Assay wurden zunächst THP-1-XBlue™-MD-2-CD14-Zellen mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  pro Well einer 96-Well-Flachbodenplatte im Sechsfachansatz pro Behandlung ausplattiert und mit PCSK (20µg/ml) bzw. mit Wasser als Kontrolle für 24h behandelt. Die Zellen wurden bei 200g und RT für 5min zentrifugiert und einmal mit Wachstumsmedium gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen für 18, 42 und 66h mit MTX (10µM) oder NaCl als Kontrolle behandelt. Als Positivkontrolle wurden zusätzlich Zellen im Sechsfachansatz ausplattiert und über den gesamten Zeitraum mit LPS (1µg/ml) nach Herstellerangaben behandelt. Ebenfalls in Sechsfachansatz wurden Zellen mit Wasser für die Negativkontrolle behandelt und Wachstumsmedium als Leerwertkontrolle verwendet. Nach der jeweiligen Behandlungsdauer wurden je 180µl *Quanti-Blue*™ pro Well einer neuen 96-Well-Flachbodenplatte vorgelegt und je 20µl des Überstandes der zu untersuchenden Zellen dazu pipettiert. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 2h. Die Platte wurde bei 660nm am ELISA-Reader *ELx808* gemessen und die Daten mit der *MikroWin*-Software dokumentiert. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Mediumleerwerte berechnet und von den einzelnen Messwerten der behandelten THP-1-XBlue™-MD-2-CD14-Zellen subtrahiert.

#### 2.2.6.2 Nachweis der metabolischen Aktivität (MTS-Assay)

Der kolorimetrische Nachweis der metabolischen Aktivität erfolgte mittels dem *CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation-Assay*. Hierfür werden die Zellen mit dem Tetrazoliumsalz MTS ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium)) und dem Stabilisator Phenazin-Ethosulfat (PES) behandelt. Die Katalysierung von Nikotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH) zu Nikotinamadenindinukleotid (NADH), das von Dehydrogenasen in aktiven Zellen gebildet wird, führt zur Reduktion von MTS zu Formazan. Nach einer bestimmten Inkubation wird die Absorption gemessen. Die Menge des gebildeten Formazan entspricht der gemessenen Absorption und somit auch der Anzahl lebender Zellen.

Für den Nachweis der metabolischen Aktivität wurden 10.000 THP-1-, Caco-2- oder LS 174T-Zellen pro Well einer 96-Well-Flachbodenplatte im Sechsfachansatz in 100µl Medium ausplattiert und mit PCSK (0,2 bis 20µg/ml) bzw. Wasser als Kontrolle für 24h behandelt. Nach einmaligem Waschen mit Wachstumsmedium wurde den Zellen für weitere 18, 42 oder 66h MTX (10µM) oder NaCl zugefügt. Als Leerwertkontrolle wurde ebenfalls in Sechsfachansatz Wachstumsmedium verwendet. Nach Behandlung der Zellen wurden diese für 2h mit MTS nach Herstellerangabe behandelt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 490nm und einer Referenzwellenlänge von 660nm am ELISA-Reader *ELx808* gemessen und die Daten mit der *MikroWin*-Software aufgezeichnet. Für die Auswertung der Messung wurde der Mittelwert der Mediumleerwerte berechnet und von den einzelnen Messwerten der Zellen subtrahiert.

#### 2.2.6.3 Nachweis der Laktatdehydrogenase-Aktivität (LDH-Assay)

Die Laktatdehydrogenase-Aktivität wurde mit Hilfe des *LDH Cytotoxicity Kit II* bestimmt. Zelltod bzw. Zytotoxizität werden durch den Schaden der Plasmamembran bestimmt. Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein stabiles Enzym, das in allen Zelltypen vorhanden ist und bei Schäden der Plasmamembran zügig aus der Zelle in das Zellwachstumsmedium geschleust wird. Daher wird LDH oft als Marker für



Zytotoxizität verwendet. Bei diesem Assay oxidiert LDH Laktat, um Nikotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) zu generieren, das wiederum mit dem wasserlöslichen Tetrazoliumsalz WST (*Water Soluble Tetrazolium*) reagiert. Hierbei entsteht das gelb-orange Formazan. Die gemessene Farbintensität korreliert mit der Anzahl lysierter Zellen.

Der LDH-Assay wurde gruppenintern freundlicherweise von Dr. rer. nat. Annette Eyking nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden 25.000 THP-1-Zellen in 100µl Medium pro Well einer 96-Well-Flachbodenplatte im Sechsfachansatz ausplattiert und mit PCSK (20µg/ml) bzw. Wasser als Kontrolle für 24h behandelt. Nach einmaligem Waschen mit Wachstumsmedium wurde den Zellen für weitere 66h MTX (10µM) oder NaCl zugefügt. Als Leerwertkontrolle diente ebenfalls im Sechsfachansatz 100µl Wachstumsmedium pro Well, als Negativkontrolle unbehandelte Zellen. Zusätzlich wurden Zellen im Sechsfachansatz ausplattiert und mit 10µl *Cell Lysis Solution* bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  für 30min behandelt, um die maximale Menge an LDH zu bestimmen. Diese dienten anschließend als Positivkontrolle. Nach einer Inkubation bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  für 30min wurde die Platte nochmals geschwenkt, um sicherzustellen, dass sich das LDH im Medium gleichmäßig verteilt hat. Die Platte wurde danach bei 600g für 10min zentrifugiert und 10µl des Überstands in eine neue 96-Well-Flachbodenplatte transferiert. Zusätzlich wurde 100µl *LDH Reaction Mix* in die Wells pipettiert, die Platte wurde geschwenkt und bei RT im Dunkeln für 30min inkubiert. Anschließend wurde die Platte am ELISA-Reader *ELx808* bei 450nm mit einer Referenzwellenlänge von 660nm gemessen. Die *MikroWin*-Software stellte die Daten dar. Der Mittelwert der Leerwertkontrollen wurde berechnet und von den Werten der Proben subtrahiert. Die prozentuale Zytotoxizität wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{zu untersuchende Probe} - \text{unbehandelte Zellen}}{\text{lysierte Zellen} - \text{unbehandelte Zellen}} \times 100$$

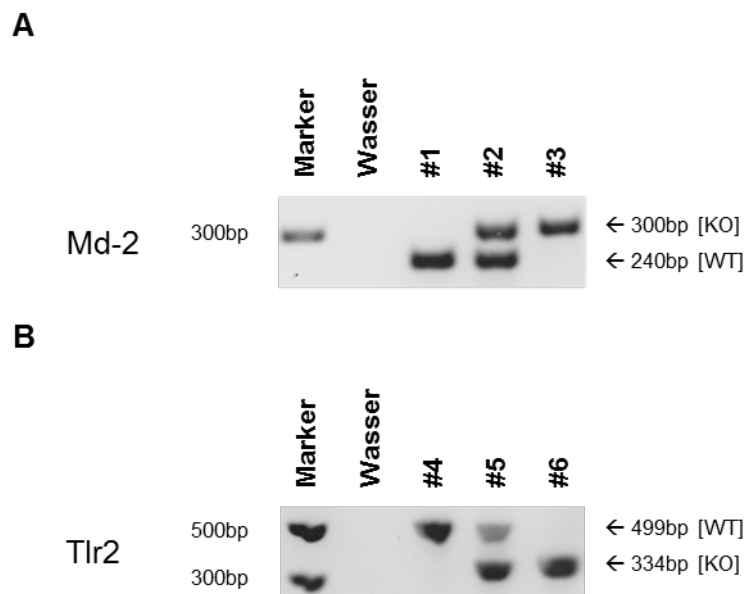
### **2.2.7 Statistik**

Die Daten wurden mit *Microsoft Excel 2010* erfasst und mit *GraphPad Prism*-Software statistisch untersucht. Sie werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (*Standard Error of the Mean*, SEM) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test untersucht. Als signifikant wurden Werte ab  $p < 0,05$  eingestuft.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Genotypisierung von unterschiedlichen Mausstämmen

TLR2 KO-Mäuse wurden in MD-2 KO-Mäuse [beide C57BL6/J; >F10] zur Erzeugung von TLR2/MD-2 dKO-Mäusen eingekreuzt. Die Genotypisierung wurde mittels PCR-Analyse der genomischen DNA, die aus dem Schwanz isoliert wurde, unter Verwendung von allelspezifischen Primern durchgeführt. Die nach der Verkreuzung von heterozygoten Mäusen entsprechend den Mendel'schen Regeln geborenen homozygoten (TLR2/MD-2 dKO-) Mäuse waren phänotypisch unauffällig. Sie wiesen eine normale Entwicklung und einen gesunden Habitus auf. Durch die An- bzw. Abwesenheit der Transgen-Kopien von *Tlr2* und *Md-2* im Mausgenom konnten diese eindeutig als WT, KO oder HE identifiziert werden. Eine beispielhafte Genotypisierung ist in Abb. 3.1 dargestellt.



**Abb. 3.1: Genotypisierung von unterschiedlichen Mausstämmen mit PCR.**

Genomische DNA wurde aus den Schwanzspitzen von WT-, TLR2 KO- und MD-2 KO-Mäusen isoliert. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR unter Verwendung von allelspezifischen Primern für die Gene (A) *Md-2* und (B) *Tlr2*. Die DNA-Auftrennung mittels 2%iger Agarose-Gelelektrophorese fand bei 90V für ca. 45min statt. Als Größenstandard wurde der *O'GeneRuler™ Express DNA Ladder* verwendet. Gelbilder wurden am *UVsolo* mit der *TS* Bildaufnahme-Software erstellt. Eine repräsentative Genotypisierung ist für jeden Genotyp anhand verschiedener Proben (#1 bis #6) exemplarisch dargestellt (WT: #1, #4; KO: #3, #6; HE: #2, #5). Die negative Wasser-Kontrolle bestätigt, dass die PCR ohne DNA-Kontamination durchgeführt wurde.

Die Md-2-PCR mit der DNA einer WT-Maus (#1) zeigte eine typische Bande bei 240bp, die einer MD-2 KO-Maus (#2) eine Bande bei 300bp, während die einer HE-Maus (#3) entsprechend beide Banden aufwies (Abb. 3.1 A). Bei Mäusen mit einem Tlr2-WT-Genotyp (#4) wurde eine Bande bei 499bp beobachtet (Abb. 3.1 B). Die Tlr2-PCR erbrachte mit der DNA von TLR2 KO-Mäusen eine Bande bei 334bp, während heterozygote Mäuse erwartungsgemäß DNA-Banden bei 334bp und 499bp aufwiesen.

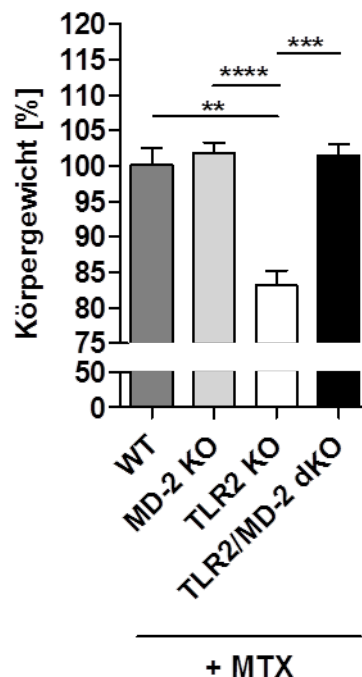
### **3.2 Phänotypisierung von Mäusen mit MTX-induzierter intestinaler Mukositis**

Zur Untersuchung der funktionellen Rolle von Tlr2 und Tlr4 in der Pathogenese von Chemotherapie-induzierter Mukositis wurden WT-, MD-2 KO-, TLR2 KO- und TLR2/MD-2 dKO-Mäuse im Alter von durchschnittlich neun Wochen *i.p.* mit 40mg MTX/kg Körpergewicht einmal täglich für vier Tage behandelt. Alle Mäuse wurden täglich gewogen und zweimal täglich klinisch untersucht. Hierbei wurde auf den Habitus geachtet. Der Versuch wäre beispielsweise bei einer akut auftretenden „Buckelbildung“ vorzeitig abgebrochen worden, ebenso bei einem Gewichtsabfall von  $\geq 20\%$  (bezogen auf das Ausgangsgewicht am Versuchsbeginn). Ein weiteres Abbruchkriterium wäre ein auffälliges Verhalten, wie verminderte Bewegung bis hin zu akuter Apathie. Verweigerung der Futter- und/oder Wasseraufnahme wie auch das Einstellen der optimalen Fellpflege hätten ebenfalls zu einer vorzeitigen Versuchsbeendigung geführt. Jedoch war ein vorzeitiger Versuchsabbruch in Folge einer der oben aufgeführten Abbruchkriterien bei keiner Maus notwendig. Der Versuch wurde an Tag 7 mit der Organentnahme planmäßig beendet. Anhand der im Folgenden dargestellten Parameter wurde der Verlauf der MTX-induzierten Mukositis analysiert und die einzelnen Mäusestämme untereinander verglichen.

### 3.2.1 Klinische und histopathologische Parameter

#### 3.2.1.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht von WT-, MD-2 KO-, TLR2 KO- und TLR2/MD-2 dKO-Mäusen wurde während des Versuches täglich dokumentiert. Abb. 3.2 zeigt das Körpergewicht an Tag 7 im Verhältnis zu Tag 0.



**Abb. 3.2: Effekt der MTX-Gabe auf das Körpergewicht an Tag 7.**

WT-, MD-2 KO-, TLR2 KO- und TLR2/MD-2 dKO-Mäuse im Alter von durchschnittlich neun Wochen wurden *i.p.* mit oder ohne MTX (40mg/kg Körpergewicht) einmal täglich für vier Tage behandelt (Tag 0 bis Tag 3). Die Organentnahme erfolgte an Tag 7. Das Körpergewicht an Tag 7 wird im Verhältnis zu Tag 0 (n=3-6 pro Gruppe) dargestellt. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

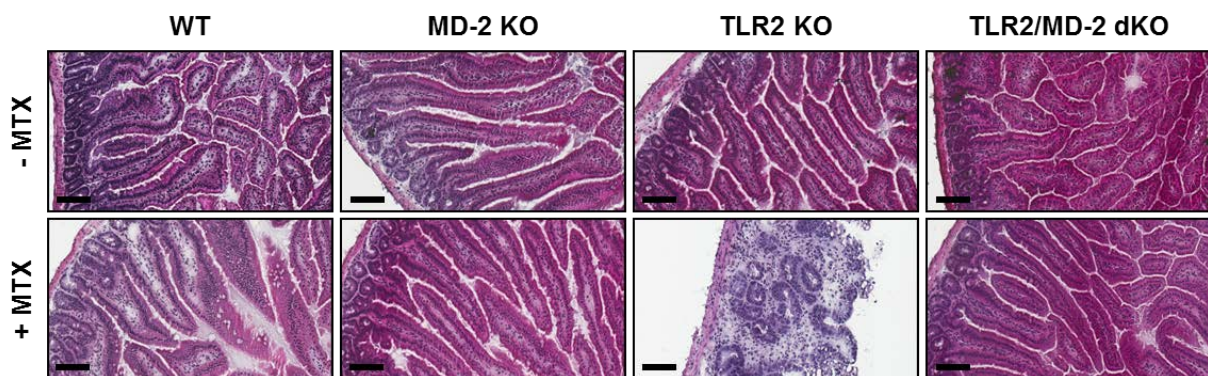
TLR2 KO-Mäuse wiesen nach MTX-Gabe bis zur Organentnahme einen kontinuierlichen Gewichtsverlust auf (Abb. 3.2). Die zusätzliche genetische Deletion von Md-2 hingegen verhinderte den Gewichtsverlust der TLR2 KO-Mäuse. WT- und MD-2 KO-Mäuse zeigten keine wesentliche Änderung des Körpergewichts nach MTX-Exposition.

Der pathologische Verlust des Körpergewichtes deutete auf eine signifikante Morbidität unter Chemotherapie bei Verlust von Tlr2 hin. Aufgrund der Tatsache, dass die Mäuse während der Behandlung die Futter- und Wasseraufnahme nicht

verweigert haben, könnte der Körperverlust pathophysiologisch mit Malassimilation aufgrund der Dünndarm-Entzündungsreaktion (Kapitel 3.2.1.2) begründet werden.

### 3.2.1.2 Histopathologie des Verdauungstraktes

Der Grad der Entzündungsaktivität im Gastrointestinaltrakt von WT-, MD-2 KO-, TLR2 KO- und TLR2/MD-2 dKO-Mäusen nach MTX-Gabe wurde zunächst histopathologisch beurteilt. Hierfür wurden das proximale Jejunum, das terminale Ileum und das distale Colon jeder Maus an Tag 7, wie in *Material und Methoden* beschrieben, entfernt. Gefrierschnitte der Organe wurden angefertigt und mit H/E angefärbt.



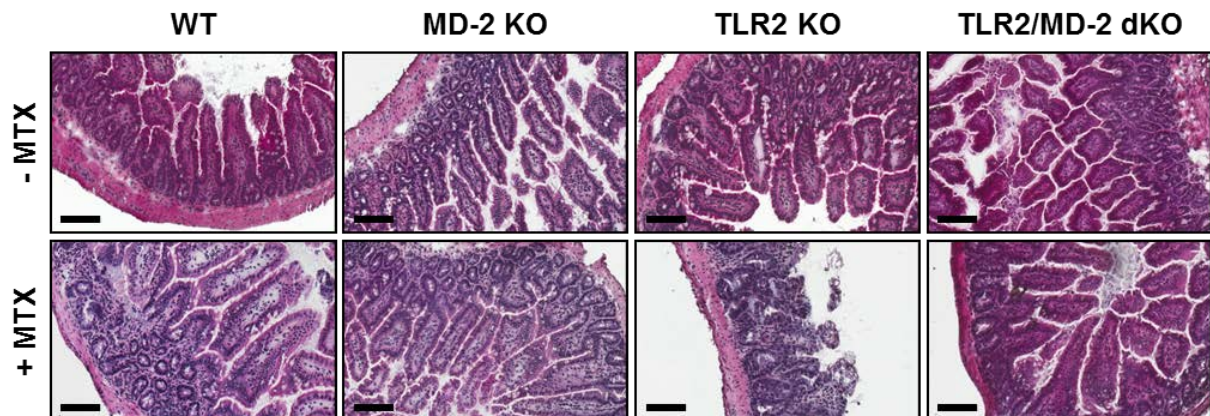
**Abb. 3.3: Histopathologie des proximalen Jejunums nach MTX-Gabe.**

WT-, MD-2 KO-, TLR2 KO- und TLR2/MD-2 dKO-Mäuse im Alter von durchschnittlich neun Wochen wurden *i.p.* mit oder ohne MTX (40mg/kg Körpergewicht) einmal täglich für vier Tage behandelt (Tag 0 bis Tag 3). Die Organentnahme erfolgte an Tag 7. Gefrierschnitte vom proximalen Jejunum wurden routinemäßig mit H/E angefärbt und am Aperio ScanScope®-System dokumentiert (Maßstabsbalken 100µm). Ein repräsentatives Bild ist für jeden Genotyp pro Kondition dargestellt.

Die histopathologische Untersuchung des proximalen Jejunums (Abb. 3.3) wies in TLR2 KO-Mäusen nach MTX-Exposition auf eine hochgradige intestinale Mukositis hin. Die Mukosa aller MTX-behandelten TLR2 KO-Mäuse zeigte im proximalen Jejunum Kryptenhypoplasie mit Villusatrophie sowie Depletion der Becherzellen. Es wurden vermehrt mukosale Erosionen und inflammatorische Infiltrate festgestellt, die bis in die Submukosa reichten. Der genotoxische Schaden unter MTX-Mukositis spiegelte klinisch den Gewichtsverlust (Abb. 3.2) wider. TLR2 KO-Mäuse, die zusätzlich eine Md-2-Deletion aufwiesen, entwickelten hingegen nur eine geringgradig ausgeprägte Mukositis, mit vereinzelten inflammatorischen Infiltraten in der Lamina Propria. Es wurde weder ein signifikanter Becherzellverlust noch eine

Krypten- und Villusatrophie dokumentiert. Die Kontrollen (WT- und MD-2 KO-Mäuse) zeigten nach Chemotherapie jeweils histopathologisch ein normales proximales Jejunum ohne signifikante Anzeichen einer Mukositis.

Das terminale Ileum von TLR2 KO-Mäusen zeigte nach MTX-Injektion gleichfalls Anzeichen einer Mukositis (Abb. 3.4).

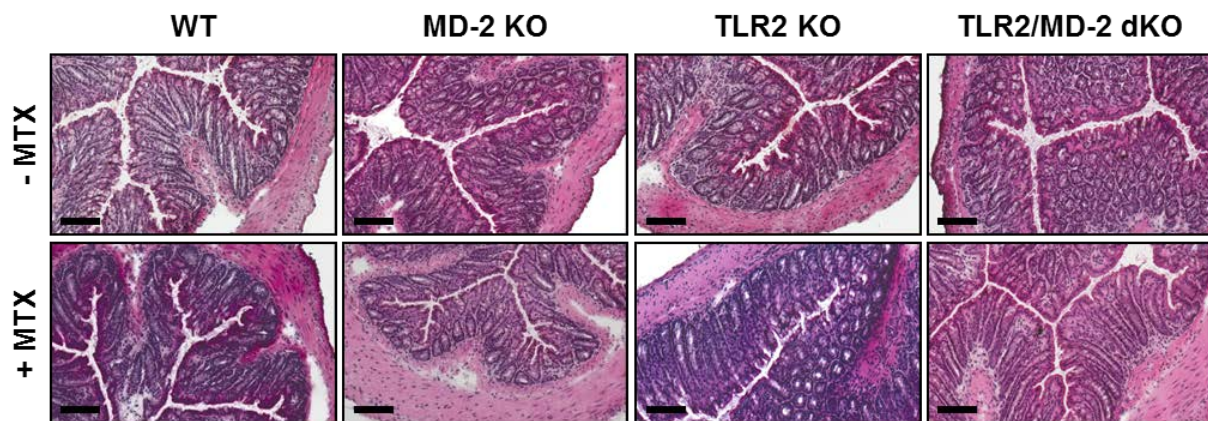


**Abb. 3.4: Histopathologie des terminalen Ileums nach MTX-Gabe.**

WT-, MD-2 KO-, TLR2 KO- und TLR2/MD-2 dKO-Mäuse im Alter von durchschnittlich neun Wochen wurden *i.p.* mit oder ohne MTX (40mg/kg Körpergewicht) einmal täglich für vier Tage behandelt (Tag 0 bis Tag 3). Die Organentnahme erfolgte an Tag 7. Gefrierschnitte vom terminalen Ileum wurden routinemäßig mit H/E angefärbt und am Aperio ScanScope®-System dokumentiert (Maßstabsbalken 100µm). Ein repräsentatives Bild ist für jeden Genotyp pro Kondition dargestellt.

Im Vergleich zum proximalen Jejunum wurden aber nur ein geringerer Becherzell- und Kryptenverlust und wenige inflammatorische Infiltrate in der Lamina Propria nach Chemotherapie festgestellt (Abb. 3.4). Es kam zudem lediglich zur Entdifferenzierung des Epithels und zu einer mittelgradigen Villusatrophie. TLR2/MD-2 dKO-Mäuse wiesen im Unterschied zu TLR2 KO-Mäusen im terminalen Ileum, vergleichbar mit MTX-behandelten WT- und MD-2 KO-Kontrollmäusen, keine Zeichen einer durch MTX-verursachten Mukositis auf.





**Abb. 3.5: Histopathologie des Colons nach MTX-Gabe.**

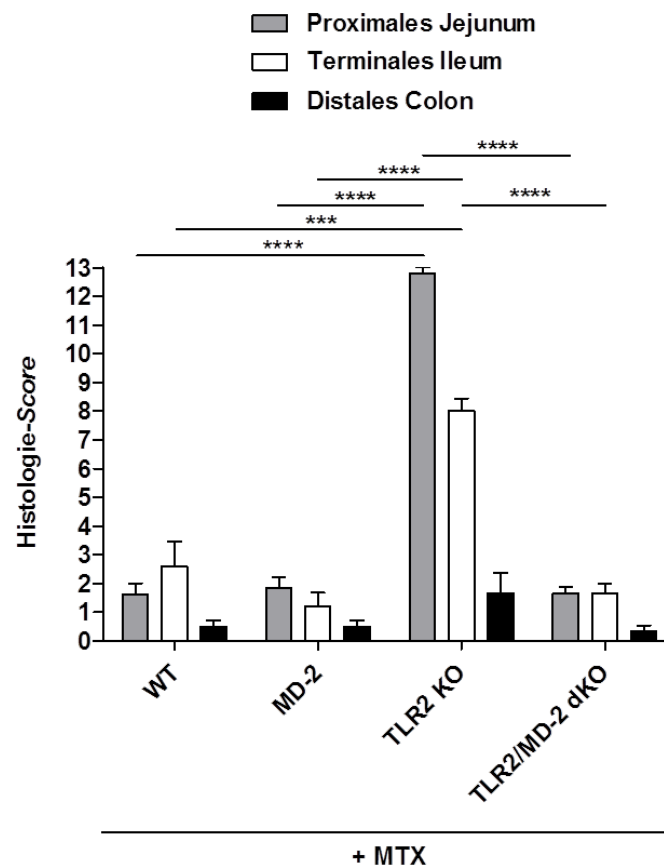
WT-, MD-2 KO-, TLR2 KO- und TLR2/MD-2 dKO-Mäuse im Alter von durchschnittlich neun Wochen wurden *i.p.* mit oder ohne MTX (40mg/kg Körpergewicht) einmal täglich für vier Tage behandelt (Tag 0 bis Tag 3). Die Organentnahme erfolgte an Tag 7. Gefrierschnitte vom Colon wurden routinemäßig mit H/E angefärbt und am Aperio ScanScope®-System dokumentiert (Maßstabsbalken 100µm). Ein repräsentatives Bild ist für jeden Genotyp pro Kondition dargestellt.

Bei der histopathologischen Untersuchung des distalen Colons wurden in allen vier Mausstämmen nach Chemotherapie keine signifikanten Anzeichen einer Mukositis festgestellt (Abb. 3.5).

Aufgrund der zuvor beschriebenen Beobachtungen wurden folgende pathologische Hauptkriterien als Maß der Chemotherapie-induzierten Mukositis festgelegt und ein neuer Histologie-Score für die standardisierte Quantifizierung generiert (Kapitel 2.2.2.8.3, Tabelle 2.4): Zum einen wurde der Verlust von Becherzellen und Krypten untersucht, der teilweise in mehr als 50% des gefärbten Gewebes festgestellt wurde. Zum anderen wurde die Morphologie des Epithels bewertet, wobei zwischen normaler Morphologie über Abflachung des Epithels bis hin zur mukosalen Erosion quantifiziert wurde. Die Länge der Villi wurde geschätzt, da bei Entzündung eine Verkürzung von über 50% nachweisbar war. Das Ausmaß der Infiltration wurde bestimmt, indem untersucht worden ist, welche Schichten der Mukosa von inflammatorischen Infiltraten betroffen waren.

Die Beobachtungen, die im proximalen Jejunum, terminalen Ileum und distalen Colon gemacht wurden, wurden entsprechend als Histologie-Score in Abb. 3.6 zusammengefasst.





**Abb. 3.6: Quantifizierung der histopathologischen Daten nach MTX-Gabe.**

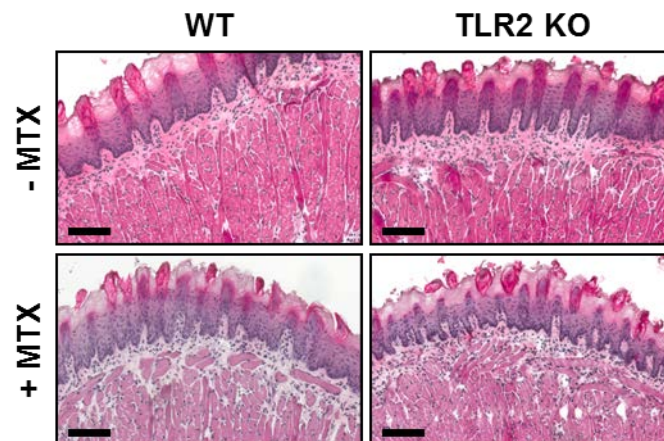
WT-, MD-2 KO-, TLR2 KO- und TLR2/MD-2 dKO-Mäuse im Alter von durchschnittlich neun Wochen wurden *i.p.* mit oder ohne MTX (40mg/kg Körpergewicht) einmal täglich für vier Tage behandelt (Tag 0 bis Tag 3). Die Organentnahme erfolgte an Tag 7. Die Histopathologie von proximalem Jejunum, terminalem Ileum und distalem Colon der Mäuse wurden jeweils mittels eines standardisierten Histologie-Scores anhand der Kriterien in Tabelle 2.4 untersucht (n=3-4 pro Gruppe). Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

TLR2 KO-Mäuse wiesen eine hochgradige MTX-induzierte Mukositis im proximalen Jejunum mit einem Histologie-Score von durchschnittlich  $12,8 \pm 0,2$  auf. Das proximale Jejunum von WT-Mäusen wurde nach MTX-Exposition mit einem Score von  $1,6 \pm 0,4$ , das von MD-2 KO- und TLR2/MD-2 dKO-Mäusen mit  $1,8 \pm 0,4$  bzw.  $1,7 \pm 0,2$  bewertet.

Der Histologie-Score des terminalen Ileums von MTX-behandelten TLR2 KO-Mäusen von  $8,0 \pm 0,4$  verdeutlichte die in Abb. 3.4 festgestellte mildere Mukositis im Vergleich zum proximalen Jejunum. Die Beurteilung der WT- und MD-2 KO-Mäusen erbrachte einen Histologie-Score von  $2,6 \pm 0,9$  bzw.  $1,2 \pm 0,5$ . Der Score des terminalen Ileums von TLR2/MD-2 dKO-Mäusen betrug  $1,7 \pm 0,3$ .

Das distale Colon aller vier Mäusestämme hatte nach MTX-Gabe einen ähnlich vernachlässigbaren Histologie-Score.

Aufgrund der Tatsache, dass orale Mukositis zu den häufigsten Nebenwirkungen der Chemotherapie gehört, wurden die Zungen von WT- und TLR2 KO-Mäusen histologisch mittels H/E-Färbung auf Epithelschäden überprüft (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7: Histopathologie der Zunge nach MTX-Gabe.**

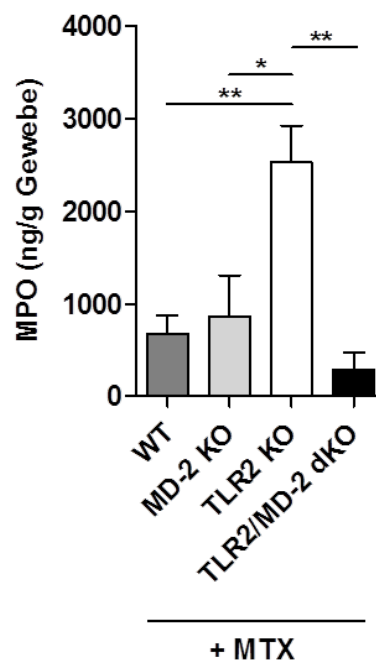
WT- und TLR2 KO-Mäuse im Alter von durchschnittlich neun Wochen wurden *i.p.* mit oder ohne MTX (40mg/kg Körpergewicht) einmal täglich für vier Tage behandelt (Tag 0 bis Tag 3). Die Organentnahme erfolgte an Tag 7. Gefrierschnitte von der Zunge wurden routinemäßig mit H/E angefärbt und am Aperio ScanScope®-System dokumentiert (Maßstabsbalken 100µm). Ein repräsentatives Bild ist für jeden Genotyp pro Kondition dargestellt.

Die Zungen von WT- wie auch die von TLR2 KO-Mäusen zeigten nach der MTX-Verabreichung keine Epithelschäden. Das heißt, dass keine unregelmäßig geformten Epithelzellen und keine Reduktion der Zelldichte festgestellt wurden. Keratinschicht, funktionelle Schicht und Germinativschicht waren eindeutig abgrenzbar.

Zusammengefasst zeigten die Daten, dass der Verlust von Tlr2 nach MTX-Gabe zu einer hochgradigen Mukositis vor allem im proximalen Jejunum führte. Dabei war die Aktivität der MTX-induzierten Mukositis unabhängig vom Verwandtschaftsgrad der Mäuse. Dieses Ergebnis weist auf eine essentielle Funktion von Tlr2 hin, die Dünndarm-Mukosa vor Chemotherapie-induzierter Genotoxizität zu schützen. Die zusätzliche Deletion von Md-2 hingegen hemmte signifikant die Mukositisentwicklung im Dünndarm von TLR2 KO-Mäusen unter MTX. Demnach scheint der LPS-Signalweg via Md-2/Tlr4 eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der MTX-induzierten intestinalen Mukositis bei Tlr2-Defizienz zu spielen.

### 3.2.2 Oxidativer Stress

Anschließend wurde der Einfluss von MTX auf die MPO-Aktivität als quantitativer Marker für oxidativen Stress im proximalen Jejunum von WT-, MD-2 KO-, TLR2 KO- und TLR2/MD-2 dKO-Mäusen untersucht. Hierfür wurde das proximale Jejunum zunächst, wie in *Material und Methoden* beschrieben, lysiert und anschließend im MPO-ELISA eingesetzt (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8: Der oxidative Stress nach MTX-Gabe im proximalen Jejunum.**

WT-, MD-2 KO-, TLR2 KO- und TLR2/MD-2 dKO-Mäuse im Alter von durchschnittlich neun Wochen wurden *i.p.* mit oder ohne MTX (40mg/kg Körpergewicht) einmal täglich für vier Tage behandelt (Tag 0 bis Tag 3). Die Organentnahme erfolgte an Tag 7. Die MPO-Aktivität als Marker für oxidativen Stress wurde im proximalen Jejunum mit Hilfe des *Mouse MPO*-ELISAs analysiert. Der hierbei entstandene Farbumschlag wurde bei 450nm mit einer Referenzwellenlänge von 570nm am ELISA-Reader *ELx808* gemessen. Der Mittelwert der Proben wurde berechnet und die Menge an MPO pro Gramm des initial eingesetzten Gewebes ermittelt (n=3-5 pro Gruppe). Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von zwei unabhängigen Versuchen. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

Die MPO-Menge im proximalen Jejunum von MTX-behandelten TLR2 KO-Mäusen war im Vergleich zur MPO-Menge von WT- und MD-2 KO-Mäusen signifikant erhöht und betrug durchschnittlich  $2528 \pm 401$  ng MPO pro Gramm des eingesetzten Gewebes. Zusätzliche Md-2-Defizienz bei TLR2 KO-Mäusen blockierte eindeutig die Induktion des oxidativen Stresses unter Chemotherapie.

Die quantitativen Ergebnisse korrelierten mit den Resultaten des qualitativ-erstellten Histologie-Scores.

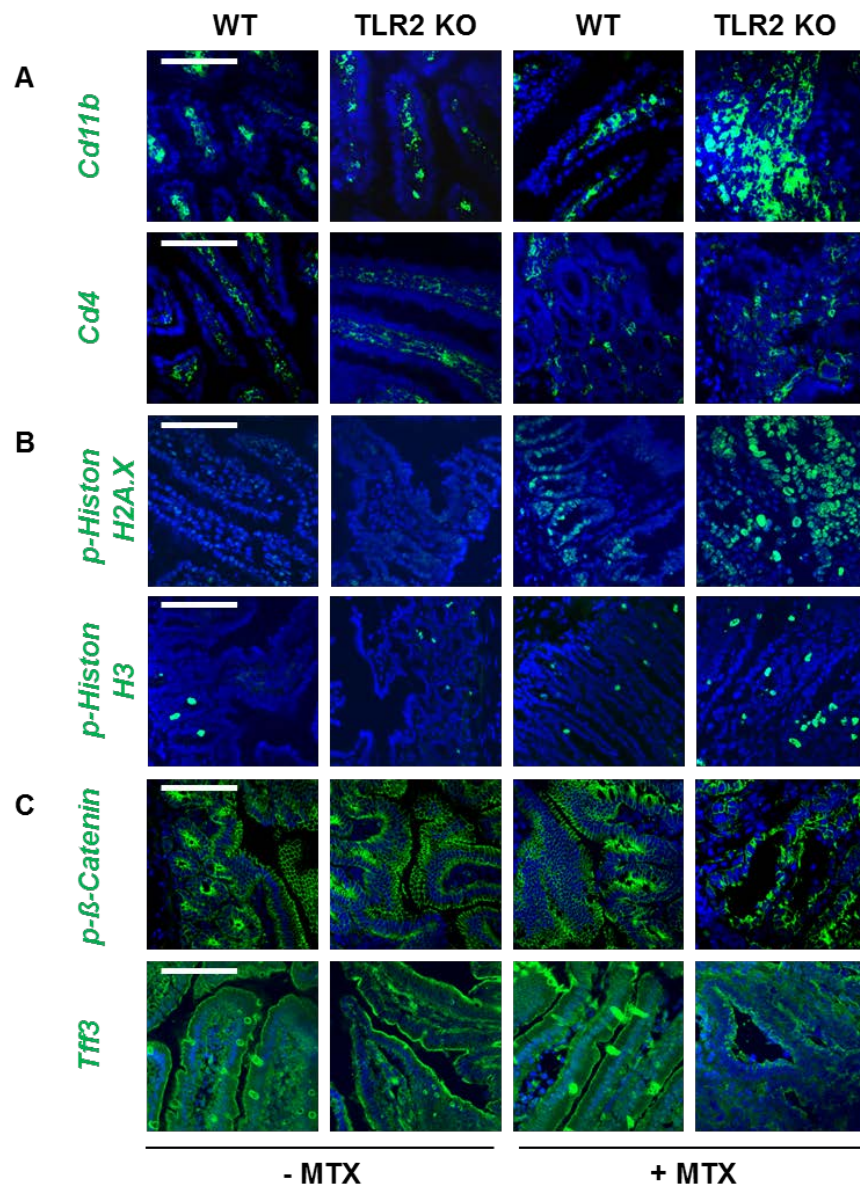
### 3.2.3 Inflammatorische Genotoxizität

TLR2 KO-Mäuse zeigten nach MTX-Exposition inflammatorische Infiltrate in der Lamina Propria des proximalen Jejunums (Abb. 3.3). Immunfluoreszenzfärbungen veranschaulichten, dass die Infiltrate nicht aus Cd4<sup>+</sup>-T-Zellen, sondern hauptsächlich aus Cd11b<sup>+</sup>-myeloischen Zellen bestanden (Abb. 3.9 A). Diese Akkumulation war an Tag 7 weder in unbehandelten und MTX-behandelten WT-Mäusen noch in unbehandelten TLR2 KO-Mäusen nachweisbar.

In den Cd11b<sup>+</sup>-dominierenden Zellinfiltraten der MTX-behandelten TLR2 KO-Mäuse wurde eine erhöhte Anzahl an doppelsträngigen DNA-Brüchen (Phospho-Histon H2A.X<sup>+</sup>-Zellen) [156] wie auch abnormale Mitose (Phospho-Histon H3<sup>+</sup>-Zellen) festgestellt (Abb. 3.9 B). Die anderen drei Mäusegruppen zeigten diesbezüglich keine Auffälligkeiten.

Weiterhin wurde gezeigt, dass MTX-Gabe nur in TLR2 KO-Mäusen zu einer dramatischen Depolarisation von Phospho-β-Catenin in den verbliebenen IEC der Entzündungsareale führte (Abb. 3.9 C). Dies wies auf Desorganisation der Zell-Zell-Adhäsionskontakte und konsekutive Alteration der Barrierehomöostase hin. Die Expression von Tff3, das bereits als Regulator der Restitution und Migration des intestinalen Epithels beschrieben wurde [151], war ausschließlich in MTX-behandelten Tlr2-defizienten Mäusen nicht nachweisbar. Dies bestätigte den vollständigen Verlust von Becherzellen, wie histopathologisch zuvor beschrieben (Abb. 3.3).

Insgesamt belegten diese Ergebnisse, dass die Chemotherapie nur in TLR2 KO-Mäusen zu fulminantem genotoxischem Stress in der intestinalen Mukosa und zu einer Störung der intestinalen epithelialen Barriereintegrität und Wundheilung führte.

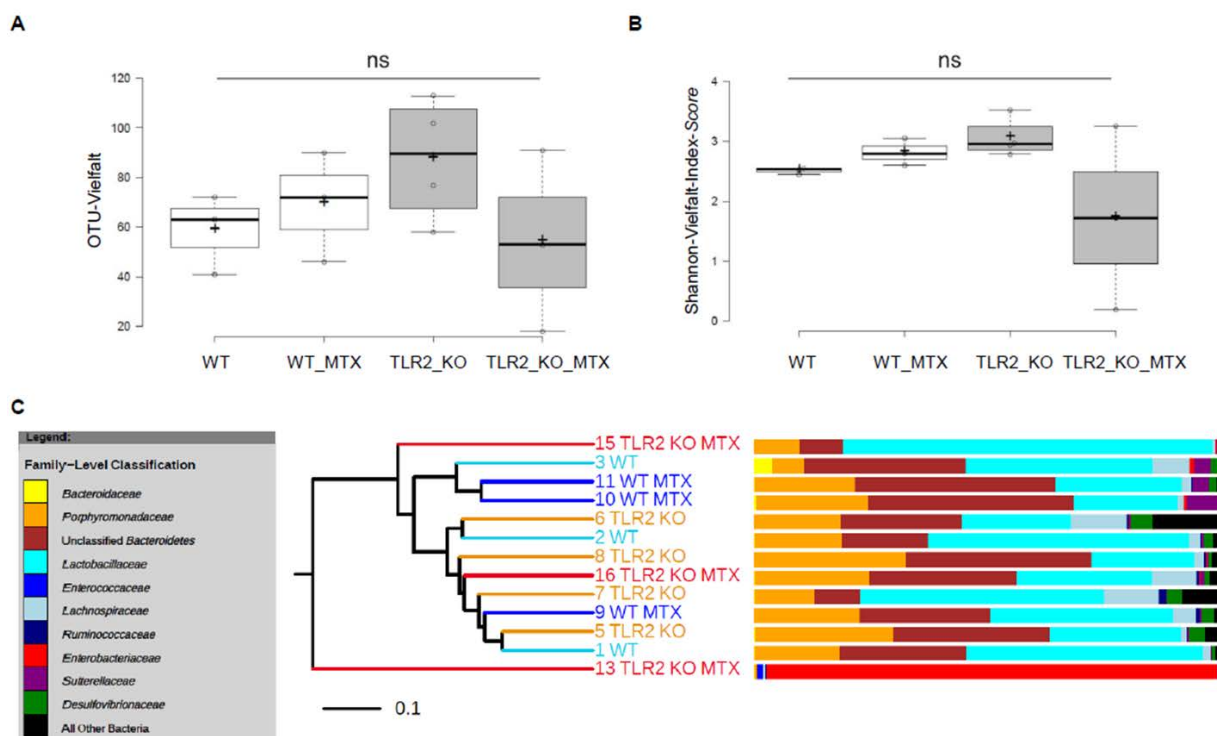


**Abb. 3.9: Immunfluoreszenzfärbung des proximalen Jejunums nach MTX-Gabe.**

WT- und TLR2 KO-Mäuse im Alter von durchschnittlich neun Wochen wurden *i.p.* mit oder ohne MTX (40mg/kg Körpergewicht) einmal täglich für vier Tage behandelt (Tag 0 bis Tag 3). Die Organentnahme erfolgte an Tag 7. Das proximale Jejunum wurde auf Marker (Alexa Fluor® 488: grün) für (A) inflammatorische Infiltrate (Cd11b, Cd4), (B) Proliferation (p-Histon H3) und DNA-Schäden (p-Histon H2A.X) und (C) intestinale epitheliale Barriereintegrität (p-β-Catenin, Tff3) untersucht. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Ausgewertet wurden die Proben mit Hilfe des Laser-Scanning-Mikroskops *Axiovert 100M LSM 510* oder des Lichtmikroskops *AxioObserver.Z1* mit *ApoTome* (Maßstabsbalken 100µm). Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Bildausschnitt zu jeder Kondition (n=4 pro Gruppe). Kontrollfärbungen mit der entsprechenden IgG-Kontrolle wurden für jeden Antikörper separat durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.4 Mikrobiota

Der Einfluss der Mikrobiota in der Pathogenese der Chemotherapie-induzierten Mukositis in Tlr-defizienten Mäusen wurde bisher vermutet, jedoch fehlen hierfür direkte experimentelle Beweise [204]. Im Rahmen einer Kooperation wurde die genomische Stuhl-DNA aus dem proximalen Jejunum von unbehandelten und von MTX-behandelten WT- und TLR2 KO-Mäusen hinsichtlich der Bakterienzusammensetzung von Dr. Alan W. Walker, PhD (*Rowett Institute of Nutrition and Health, University of Aberdeen*), und von Dr. Julian Parkhill, PhD, und Paul Scott (*Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge*) analysiert (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10: Bakterienanalyse des Stuhls aus dem proximalen Jejunum nach MTX-Gabe.**

WT- und TLR2 KO-Mäuse im Alter von durchschnittlich neun Wochen wurden *i.p.* mit oder ohne MTX (40mg/kg Körpergewicht) einmal täglich für vier Tage behandelt (Tag 0 bis Tag 3). Die Organentnahme erfolgte an Tag 7. Die DNA des Stuhls aus dem proximalen Jejunum von unbehandelten bzw. MTX-behandelten WT- und TLR2 KO-Mäusen wurde hinsichtlich der Bakterienzusammensetzung im Vergleich untersucht (n=4 pro Gruppe). Jede Maus wurde durchnummeriert. Drei von sechzehn Mäusen (#4, #12, #14) mussten aus der Wertung herausgenommen werden, da für ein eindeutiges Resultat zu wenig Sequenzen vorhanden waren. Mäuse, die MTX erhalten haben, sind mit „MTX“ markiert. (A) Die OTU-Vielfalt und (B) der Shannon-Vielfalt-Index-Score der einzelnen Gruppen wurde mit Hilfe von 1084 Sequenzen jeder Probe berechnet. ns: nicht signifikant. (C) Die phylogenetische Beziehung der einzelnen Proben zueinander wird im Dendrogramm wiedergegeben. Die Bakterienzusammensetzung jeder Probe ist im Balkendiagramm dargestellt.

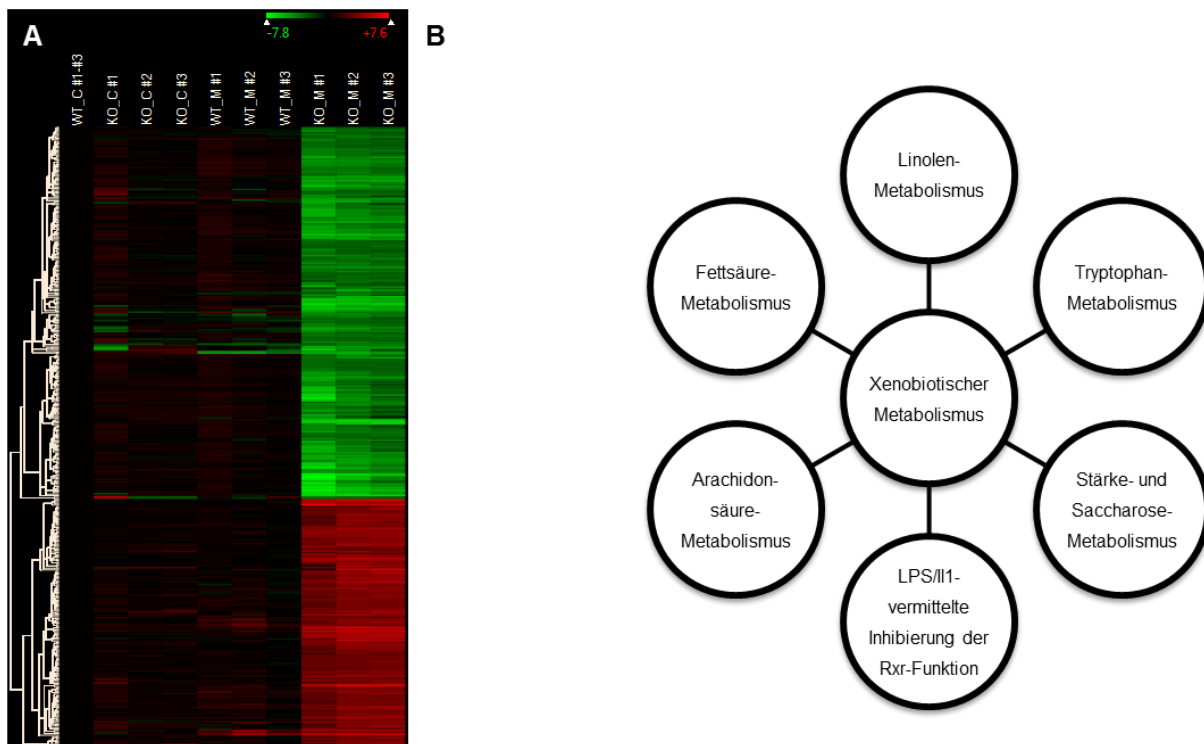


Die Bakterienanalyse des Stuhles zeigte anhand der OTU-Vielfalt (Abb. 3.10 A) und des Shannon-Vielfalt-Index-Scores (Abb. 3.10 B) keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Bakterienzusammensetzung zwischen unbehandelten bzw. MTX-behandelten WT- und TLR2 KO-Mäusen an Tag 7. Das Dendrogramm spiegelte die phylogenetische Beziehung der einzelnen Mäuse wider und zeigte deutlich, dass die einzelnen Mäusegruppen anhand der Bakterienzusammensetzung nicht voneinander abgegrenzt werden konnten (Abb. 3.10 C). Es ist möglich, dass feine Unterschiede oder ein Effekt bei Wiederholung des Versuches mit mehr Mäusen pro Gruppe oder zu einem früheren Zeitpunkt der Organentnahme detektiert werden könnten. Die Bakterienauswertung zeigte eine hochgradige Variation zwischen den individuellen Mäusen, unabhängig von Mausstamm und Behandlung, trotz gleichem Verwandtschaftsgrad durch Kreuzung heterozygoter Mäuse (sog. *littermates*). Eine TLR2 KO-Maus (#13) wies beispielsweise nach MTX-Gabe eine bakterielle Fehlbesiedlung mit *Enterobacteriaceae* auf.

Da aber, trotz der interindividuellen Variation der luminalen Bakterienkomposition, alle TLR2 KO-Mäuse vergleichbar hohe Entzündungsaktivitäten der MTX-induzierten intestinalen Mukositis zeigten, ist es eher unwahrscheinlich, dass Dysbiose den Chemotherapie-induzierten Mukosaschaden primär getriggert hat.

### 3.2.5 Genexpression

Das proximale Jejunum von WT- und TLR2 KO-Mäusen wurde nach MTX-Gabe mittels *Microarray*-Analyse untersucht, um den potenziellen Einfluss von MTX auf weitere Gene umfassend zu identifizieren. Die Genexpression der untersuchten Gene in den einzelnen Mäusegruppen wurde mit denen der unbehandelten WT-Kontrollmäuse verglichen (Abb. 3.11 A).



**Abb. 3.11: Genexpressionsprofil mittels *Microarray*-Analyse des proximalen Jejunums nach MTX-Gabe.**

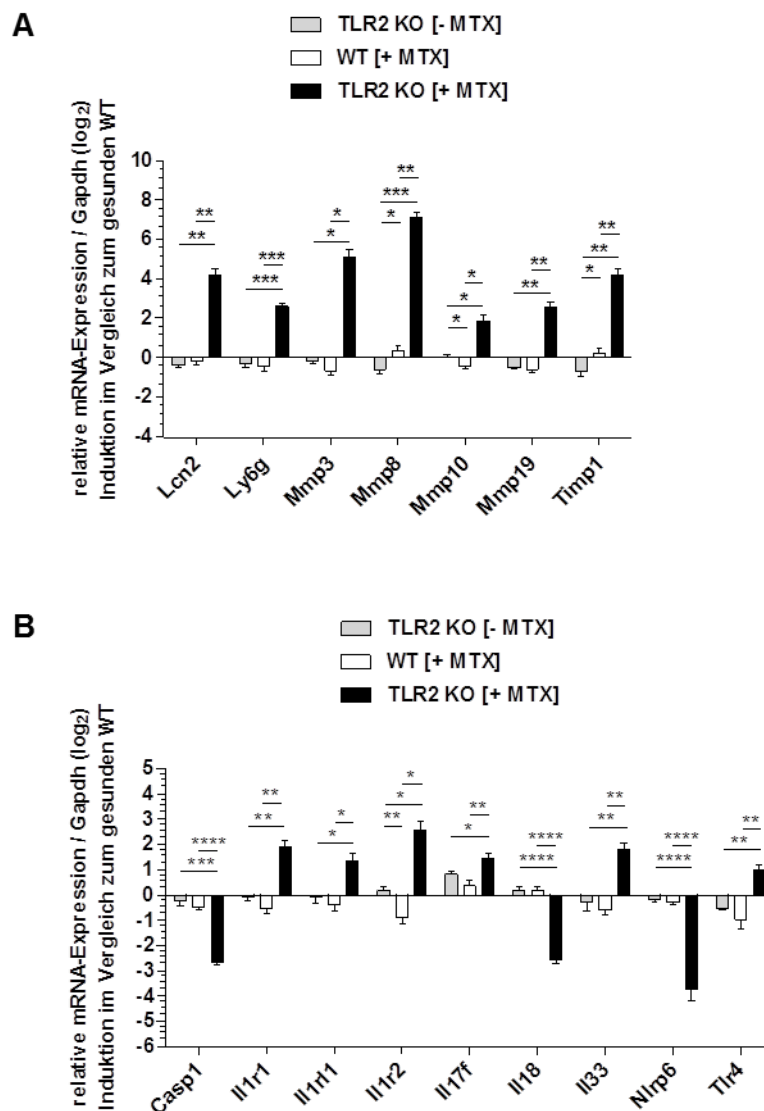
WT- und TLR2 KO-Mäuse im Alter von durchschnittlich neun Wochen wurden *i.p.* mit oder ohne MTX (40mg/kg Körpergewicht) einmal täglich für vier Tage behandelt (Tag 0 bis Tag 3). Die Organentnahme erfolgte an Tag 7. (A) Es wurde eine *Microarray*-Analyse von ausgewählten Genen im proximalen Jejunum durchgeführt. Es wurden jeweils drei Mäuse pro Gruppe (#1 bis #3) untersucht. Nur die Gene sind dargestellt, die in den einzelnen Gruppen im Vergleich zum Mittelwert der unbehandelten WT-Mäuse (WT\_C) mehr als achtfach signifikant herunter- oder hochreguliert waren ( $n=409$ , keine Duplikate). Jeder Balken der *Heatmap*-Darstellung spiegelt ein einzelnes Gen wider ( $\log_2$ -Einstellung). Hochregulierte Gene sind rot dargestellt und herunterregulierte Gene grün, während Gene, die kaum beeinflusst sind, schwarz wiedergegeben sind. Eine detaillierte Auflistung der ausgewählten Gene ist im Anhang Tabelle 6.1 beigefügt. (B) Die Pathway-Analyse mittels *Ingenuity*<sup>®</sup> bezieht sich nur auf die Gene von MTX-behandelten TLR2 KO-Mäusen, die in der *Microarray*-Analyse im Vergleich zu MTX-behandelten WT-Mäusen als signifikant reguliert erkannt wurden. Hierfür wurde die Obergrenze der  $\log_2$ -Einstellung auf 4,0 eingestellt. Es wurden 140 Gene identifiziert, die mit Hilfe von *Ingenuity*<sup>®</sup> hier als Netzwerk dargestellt wurden. Eine detaillierte Auflistung dieser Gene ist im Anhang in Tabelle 6.2 und Tabelle 6.3 dargestellt.

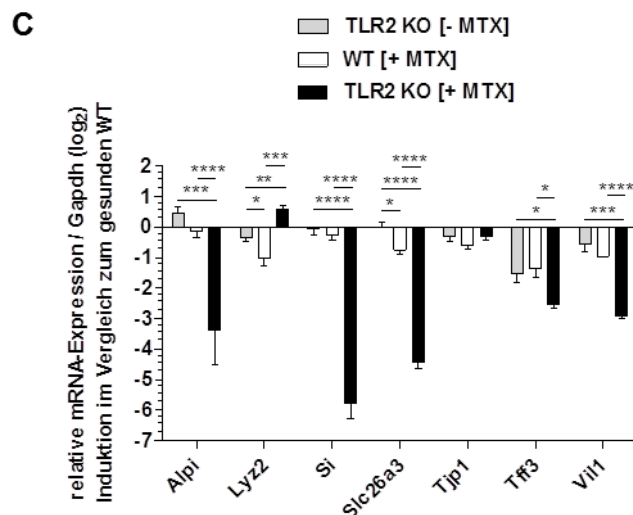
Die Genexpressionsanalyse zeigte, dass 409 Gene im proximalen Jejunum der MTX-behandelten TLR2 KO-Mäuse im Vergleich zu unbehandelten WT-Mäusen mehr als achtfach signifikant reguliert wurden. Die detaillierte Liste der einzelnen Gene ist im Anhang Tabelle 6.1 zu finden. Bei direktem Vergleich der Genexpressionsprofile von MTX-behandelten TLR2 KO-Mäusen mit MTX-behandelten WT-Mäusen wurden 140 regulierte Gene ermittelt, die laut *Ingenuity*<sup>®</sup> hauptsächlich zu kanonischen Signalwegen gehörten, die mit xenobiotischen Metabolismen assoziiert sind (Abb. 3.11 A). Einige dieser Gene beeinflussten interagierend unter anderem den Linolen-, Tryptophan-, Fettsäure- und/oder Arachidonsäure-Metabolismus, andere



waren zudem an der LPS/II-1-vermittelten Inhibierung der Rxr-Funktion und/oder am Stärke- und Saccharose-Metabolismus beteiligt (Abb. 3.11 B, Anhang Tabelle 6.2 und Tabelle 6.3).

Im Anschluss wurde das proximale Jejunum von unbehandelten bzw. MTX-behandelten WT- und TLR2 KO-Mäusen auf die Expression einzelner der oben genannten regulierten Gene mittels qRT-PCR untersucht, um das Ergebnis der *Microarray*-Analyse zumindest teilweise zu bestätigen. Hierfür wurden Gene des entzündlichen Gewebeschadens, der angeborenen und erworbenen Immunität und des intestinalen Epithels ausgewählt (Abb. 3.12) wie auch Gene von xenobiotischen Transportern und assoziierten Transkriptionsfaktoren (Abb. 3.13).





**Abb. 3.12: Bestätigung ausgewählter Gene des entzündlichen Gewebeschadens, der angeborenen und erworbenen Immunität und des intestinalen Epithels mittels qRT-PCR nach MTX-Gabe im proximalen Jejunum.**

WT- und TLR2 KO-Mäuse im Alter von durchschnittlich neun Wochen wurden *i.p.* mit oder ohne MTX (40mg/kg Körpergewicht) einmal täglich für vier Tage behandelt (Tag 0 bis Tag 3). Die Organentnahme erfolgte an Tag 7. Das proximale Jejunum wurde mit qRT-PCR auf die relative mRNA-Expression von ausgewählten Genen untersucht. Die relative Expression von Markern (A) des entzündlichen Gewebeschadens, (B) der angeborenen und erworbenen Immunität sowie (C) die von selektiven intestinalen Epithelmarker wurde analysiert (n=5-6 Mäuse pro Gruppe). Die Kopienzahl der Gene wurde auf das *housekeeping*-Gen Gapdh bezogen. Die Expression der Gene wurde auf den Mittelwert der Expression im proximalen Jejunum von unbehandelten WT-Mäusen bezogen und als x-fache Induktion angegeben ( $\log_2$ -Einstellung). Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

TLR2 KO-Mäuse wiesen im Vergleich zu WT-Mäusen nach Chemotherapie eine signifikant gesteigerte Genexpression aller hier untersuchten Mediatoren des entzündlichen Gewebeschadens auf (Abb. 3.12 A). Lcn2 (Lipocalin 2) [168] und Ly6g (*Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus G*) [50] werden hauptsächlich in Cd11b<sup>+</sup>-neutrophilen Granulozyten exprimiert. Die erhöhte Genexpression der Lcn2- und Ly6g-mRNA im proximalen Jejunum von TLR2 KO-Mäusen nach Chemotherapie könnte deshalb auf mukosale Infiltration von neutrophilen Granulozyten hindeuten. Es ist daher möglich, dass die Cd11b<sup>+</sup>-Zellen, deren Akkumulation in der Lamina Propria bei Tlr2-Defizienz nach MTX-Gabe in Abb. 3.9 A gezeigt wurde, vor allem neutrophile Granulozyten waren.

Mmp sind eine Gruppe von Proteasen, die im aktiven Zustand die extrazelluläre Matrix abbauen [139]. Aufgrund der hochregulierten mRNA-Genexpression von den hier analysierten Mmp wurde die Degradierung der extrazellulären Matrix im Tlr2-defizienten proximalen Jejunum nach MTX-Gabe angedeutet. Timp1 (*Tissue*

*Metallopeptidase Inhibitor 1*) verhindert im basalen Zustand durch Inhibierung einer Vielzahl an Mmp [139] wahrscheinlich den Zusammenbruch der extrazellulären Matrix. Andererseits wurde gezeigt, dass bei Entzündungen die Induktion der Mmp-mRNA-Genexpression durch Timp1 nicht unterbunden wird [120]. Die MTX-induzierte Genexpressionserhöhung der Timp1-mRNA in TLR2 KO-Mäusen vermochte hier die breitangelegte Hochregulation der verschiedenen Mmp ebenfalls nicht zu hemmen.

Im Vergleich zu TLR2 KO-Mäusen nach MTX-Injektion zeigten MTX-behandelte WT-Mäuse und unbehandelte TLR2 KO-Mäuse eher eine vernachlässigbare Genexpressionsregulation der hier untersuchten Aktivatoren des entzündlichen Gewebes Schadens.

Die Genexpression von Mediatoren der angeborenen und erworbenen Immunität war ebenfalls im proximalen Jejunum von TLR2 KO-Mäusen nach MTX-Injektion signifikant verändert (Abb. 3.12 B). Zunächst wurde die mRNA-Genexpression von Nlrp6 (*NLR Family, Pyrin Domain Containing 6*) untersucht. Elinav *et al.* publizierten, dass die Dextran Sodium Sulfat (DSS)-Gabe bei Nlrp6-Defizienz in IEC zur progressiven Colitis führt [42]. Daher ist es möglich, dass die Hemmung von Nlrp6 eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber chemisch-induzierten Entzündungen verursacht. Die hier gezeigte Erniedrigung der Nlrp6-mRNA-Genexpression in der entzündeten Mukosa von TLR2 KO-Mäusen nach MTX-Gabe könnte diese Aussage stützen. Die ebenfalls durch MTX induzierte Herunterregulation der Casp1-mRNA-Genexpression bei Tlr2-Defizienz deutete auf die bereits beschriebene Nlrp6-Funktion hin, Casp1 zu regulieren [59]. Die erniedrigte Il18-mRNA-Genexpression im Tlr2-defizienten proximalen Jejunum nach MTX-Injektion wies auf den Verlust der protektiven Rolle vom TH1-Zytokin Il18 bei Mukositis hin [192]. Zudem konnte die Aussage von Dinarello, die Hemmung der Casp1-mRNA-Genexpression führe zur Inaktivierung von Il18 [39], durch die hier gezeigte Herunterregulation der beiden Gene möglicherweise bekräftigt werden.

In Abb. 3.12 wurde eine MTX-induzierte Hochregulation der Tlr4-mRNA-Genexpression gezeigt. Zusätzlich wurde in Kapitel 3.2.1.2 dargestellt, dass die Blockade des LPS-Signalweges via Md-2 die intestinale Mukositis bei Tlr2-Defizienz hemmt. Diese beiden Beobachtungen legen nahe, dass die Entstehung einer fulminanten Mukositis durch Tlr4-getriggerte Signale gefördert wird.

Die unterschiedlichen pro- und anti-inflammatorischen Interleukine und ihre Rezeptoren wurden ebenfalls durch MTX-Exposition in TLR2 KO-Mäusen signifikant reguliert (Abb. 3.12 B). Eine MTX-verursachte erhöhte mRNA-Genexpression der Il1-Rezeptoren Il1r1 (Il1 Rezeptor 1), Il1rl (Il1 Rezeptor-*Like*) 1 und Il1r2 wurde bei Tlr2-Defizienz nachgewiesen. Dies gab einen Hinweis auf einen durch MTX beeinträchtigten Il1 $\beta$ -Signalweg. Das TH17-Zytokin Il17f ist an der Rekrutierung von Neutrophilen beteiligt [94]. Daher könnte die Hochregulation der mRNA-Genexpression von Il17f auf eine neutrophile Granulozytose in der Lamina Propria hindeuten, ähnlich wie die Induktion der Lcn2- und Ly6g-mRNA (Abb. 3.12 A). Aufgrund der Beobachtung von Guabiraba *et al.*, bei Verlust von Il33 würde die Irinotecan-induzierte Mukositis abgemildert werden, wurde Il33 eine wichtige Rolle bei der Induktion von Entzündungen zugesprochen [62]. Die in Abb. 3.12 B gezeigte Hochregulation der Il33-mRNA-Genexpression in der entzündeten Darm-Mukosa von TLR2 KO-Mäusen würde ebenfalls dafür sprechen. Insgesamt kam es zu einer gleichzeitigen Aktivierung der TH1-, TH2- und TH17-Immunantwort.

Schließlich wurde die Genexpression von intestinalen Epithelmarkern untersucht (Abb. 3.12 C). Die Genexpression der Bürstensaumenzyme Si (Sucrase-Isomaltase) und Alpi (Alkalische Phosphatase, intestinal) war in der MTX-behandelten TLR2 KO-Dünndarm-Mukosa signifikant gehemmt. Diese Störung bei der mRNA-Genexpression der beiden Enzyme kann zu Malabsorption führen und letztendlich die Entstehung der hier gezeigten Mukositis fördern.

Das proximale Jejunum wirkte der MTX-induzierten Entzündung bei Tlr2-Defizienz möglicherweise mit der Hochregulation des antibakteriell-wirkenden Lysozyms 2 (Lyz2) entgegen. Die mRNA von Slc26a3 (*Solute Carrier Family 26 (Anion-Exchanger), Member 3*; Synonym: CLD (*Chloride Anion Exchanger*)), ein Anionenaustauscher in IEC, wurde in TLR2 KO-proximalen Jejunum nach MTX-Exposition erniedrigt exprimiert. Die herunterregulierte mRNA-Genexpression des

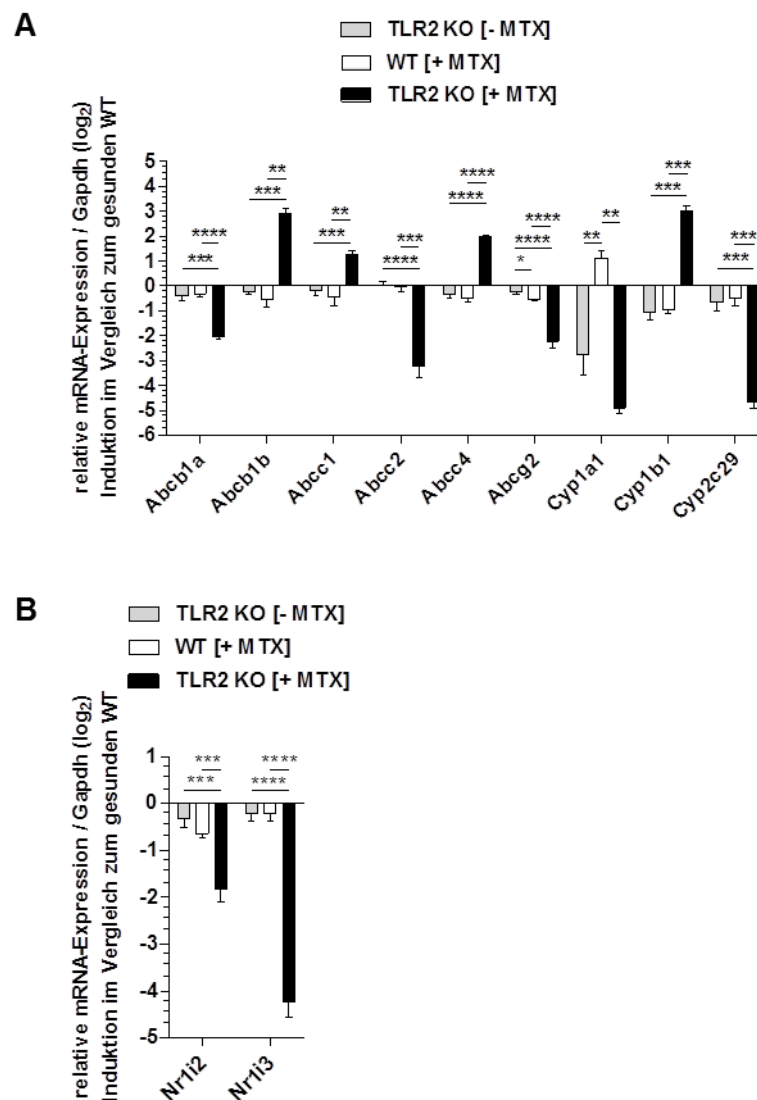
Anionenaustauschers könnte zu einer Beeinträchtigung der Absorption von Elektrolyten führen und so ebenfalls toxisch in der Dünndarm-Mukosa wirken.

Die bei der Immunfluoreszenz-Färbung bereits festgestellte Herunterregulation des Becherzellfaktors Tff3 (Abb. 3.9) bei Tlr2-Defizienz nach MTX-Gabe wurde hier auf mRNA-Ebene bestätigt. Die bei VIL1 (Villin 1) KO-Mäusen gezeigte Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber DSS-induzierter Mukositis [47] weist auf die protektive Rolle von Vil1 bei chemisch-induzierter Entzündung hin. MTX-Gabe führte bei Tlr2-Defizienz zu einer Herunterregulation der Vil1-mRNA und somit zum Zusammenbruch der IEC-Integrität.

Dennoch wurden nicht alle Gene im Tlr2-defizienten proximalen Jejunum durch MTX beeinflusst. Als Beispiel wird hier Tjp1 aufgeführt, das normalerweise durch Tlr2 in IEC reguliert wird [17, 19]. MTX schien hier keinen Effekt auf die mRNA-Genexpression bei Tlr2-Defizienz zu besitzen.

Zusammengefasst legten diese Daten nahe, dass die Gabe von Chemotherapeutika bei Tlr2-Defizienz zu erheblichen genotoxischen Schäden bei Mukositis und zu Defekten der angeborenen und erworbenen Immunität führte. Zudem wurden Störungen der Wundheilung und der IEC-Barriereintegrität induziert.

Als nächstes wurde der Effekt von PCSK auf ausgewählte Gene von Transportern und assoziierten Transkriptionsfaktoren in unbehandelten bzw. MTX-behandelten WT- und TLR2 KO-Mäusen analysiert (Abb. 3.13).



**Abb. 3.13: Bestätigung ausgewählter Gene von Transportern und assoziierten Transkriptionsfaktoren mittels qRT-PCR nach MTX-Gabe im proximalen Jejunum.**

WT- und TLR2 KO-Mäuse im Alter von durchschnittlich neun Wochen wurden *i.p.* mit oder ohne MTX (40mg/kg Körpergewicht) einmal täglich für vier Tage behandelt (Tag 0 bis Tag 3). Die Organentnahme erfolgte an Tag 7. Die relative mRNA-Expression von ausgewählten Genen wurde im proximalen Jejunum mittels qRT-PCR analysiert. (A) Transportergene und metabolisierende Enzyme (Abc und Cyp450) sowie deren (B) zentrale Transkriptionsfaktoren wurden untersucht (n=5-6 Mäuse pro Gruppe). Die Kopienzahl der Gene wurde auf das *housekeeping*-Gen Gapdh bezogen. Die Expression der Gene wurde auf den Mittelwert der Expression im proximalen Jejunum von unbehandelten WT-Mäusen bezogen und als x-fache Induktion angegeben (log<sub>2</sub>-Einstellung). Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

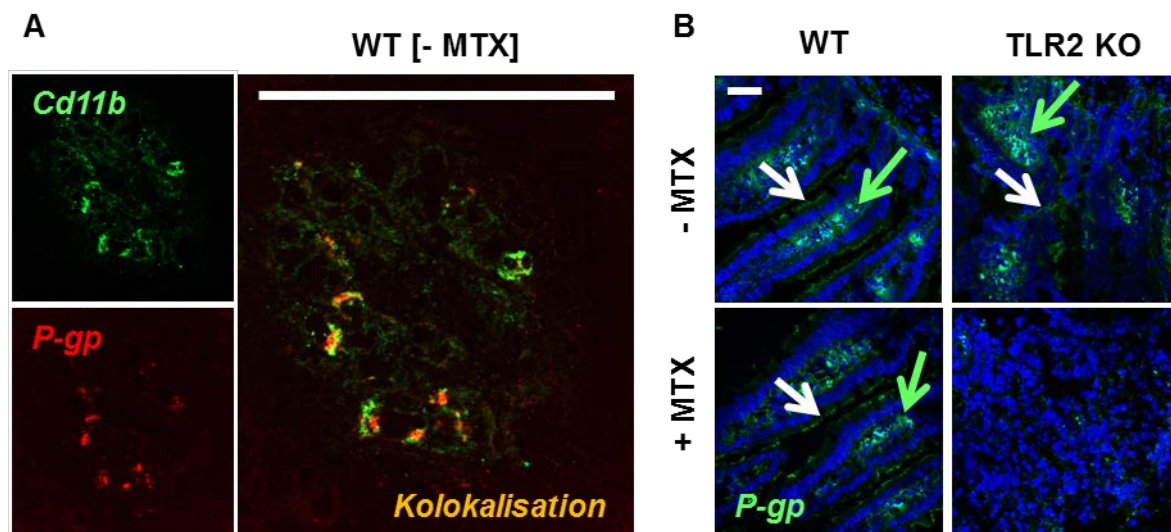
In Abb. 3.13 A wurde eine signifikante Modulation von verschiedenen Abc-Transporter- und Cyp450-Genen unter Chemotherapie in der Dünndarm-Mukosa von Tlr2-defizienten Mäusen gezeigt. TLR2 KO-Mäuse wiesen nach MTX-Gabe eine signifikant gesteigerte Expression von Abcb1b, Abcc1 und Abcc4 auf, während Abcg2 (Synonym: Bcrp1 (*Breast Cancer Resistance Protein*)) hochgradig

herunterreguliert war. MTX-Exposition bei Tlr2-Defizienz führte zu einer niedrigen Abcb1a- und Abcc2-mRNA-Expression. Die hier untersuchten Cyp450-Oxidoreduktasen wurden ebenfalls in Tlr2-defizienten Mäusen nach MTX-Injektion hochgradig moduliert. Wie in Abb. 3.13 A zu sehen, wurden Cyp1b1 und Cyp2c29 durch MTX gegensätzlich bei Tlr2-Defizienz gesteuert: Cyp1b1 zeigte eine gesteigerte, Cyp2c29 eine verminderte Expression. Die von Do *et al.* publizierten Ergebnisse, Cyp1a1 sei bereits in unbehandelten TLR2 KO-Mäusen niedrig exprimiert [40], wurden hier bestätigt. Exposition mit MTX führte weiterhin fast zum kompletten Verlust von Cyp1a1 in der Tlr2-defizienten Mukosa.

Anschließend wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren Nr1i2 und Nr1i3 (*Nuclear Receptor Subfamily 1, Group I, Member 3*; Synonym: CAR (*Constitutive Androstane Receptor*)), die eine Vielzahl an Abc-Transporter- und Cyp450-Genen regulieren, analysiert (Abb. 3.13 B). Im Gegensatz zu WT-Mäusen wurden diese in TLR2 KO-Mäusen nach MTX-Gabe signifikant herunterreguliert. Das humane ABCB1/MDR1 wird durch NR1I2 induziert [57]. Die hier dargestellte MTX-vermittelte Herunterregulation des Transkriptionsfaktors Nr1i2 in der entzündeten intestinalen Mukosa (Abb. 3.13 B) könnte sekundär die Suppression von Abcb1a bei Tlr2-Defizienz mitbewirkt haben. Der regulatorische Einfluss von Nr1i2 auf Abcc2 [85, 111] spiegelt sich in den hier gezeigten Ergebnissen wider.

### 3.2.6 P-gp-Expression

Abb. 3.13 A zeigte, dass die mRNA-Genexpression von *Abcb1a* im proximalen Jejunum von TLR2 KO-Mäusen nach MTX-Gabe signifikant herunterreguliert ist. Da MTX unter anderem ein bekanntes P-gp-Substrat ist [34, 166], wurde die Proteinexpression des Abc-Transporters P-gp mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14: Immunfluoreszenzfärbung von P-gp im proximalen Jejunum nach MTX-Gabe.**

WT- und TLR2 KO-Mäuse im Alter von durchschnittlich neun Wochen wurden *i.p.* mit oder ohne MTX (40mg/kg Körpergewicht) einmal täglich für vier Tage behandelt (Tag 0 bis Tag 3). Die Organentnahme erfolgte an Tag 7. Das proximale Jejunum wurde auf die P-gp-Expression mittels Immunfluoreszenz untersucht. (A) Dargestellt ist eine repräsentative Koimmunfluoreszenzfärbung von Cd11b (Alexa Fluor® 488: grün) und P-gp (Alexa Fluor® 350: rot) in der Lamina Propria vom proximalen Jejunum von unbehandelten WT-Mäusen (n=2). Die Kolokalisationsareale werden im fusionierten Bild gelb dargestellt (Maßstabsbalken 100µm). (B) Dargestellt ist eine repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von P-gp (Alexa Fluor® 488: grün) im proximalen Jejunum von WT- und TLR2 KO-Mäusen nach MTX-Gabe (Maßstabsbalken 50µm). Grüne Pfeile zeigen P-gp<sup>+</sup>-Zellen in der Lamina Propria, weiße Pfeile deuten auf P-gp<sup>+</sup>-Zellen im intestinalen Epithel (n=3 pro Gruppe). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Proben wurden am Laser-Scanning-Mikroskop Axiovert 100M LSM 510 oder am Lichtmikroskop AxioObserver.Z1 mit ApoTome ausgewertet. (A+B) Für jeden Antikörper wurde eine Kontrollfärbung mit der entsprechenden IgG-Kontrolle separat vorgenommen (Daten nicht gezeigt).

Die dominierende Kolokalisation von Cd11b und P-gp in Abb. 3.14 A legt nahe, dass P-gp in der Lamina Propria von unbehandelten WT-Mäusen vor allem in Cd11b<sup>+</sup>-Zellen exprimiert wird. Eine im Vergleich schwächere Expression von P-gp mittels des hier verwendeten anti-P-gp-Antikörpers (Klon C219) wurde apikal ebenfalls im intestinalen Epithel nachgewiesen (Abb. 3.14 B). Unbehandelte Tlr2-defiziente Mäuse zeigten in der Lamina Propria eine ähnlich hohe P-gp-Expression bei gleichem Zellverteilungsmuster wie WT-Kontrollmäuse. Hingegen wurde nach MTX-



---

Gabe in TLR2 KO-Mäusen ein kompletter Verlust der P-gp-Proteinexpression in der Lamina Propria festgestellt - trotz der erhöhten Anzahl an Cd11b<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 3.9 A).

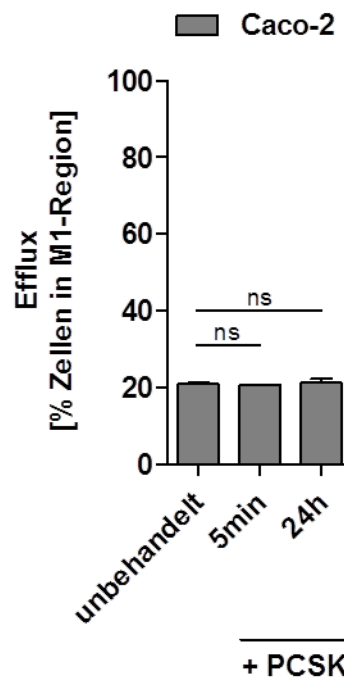
### **3.3 Wirkung der TLR2-Stimulation auf MTX-induzierte Toxizität *in-vitro***

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse wurde als nächstes mechanistisch untersucht, welche Effekte die spezifische TLR2-Aktivierung auf den MTX-induzierten toxischen Zellschaden in humanen Zelllinien hat.

#### **3.3.1 Humane IEC**

##### **3.3.1.1 MDR1-Effluxaktivität in Caco-2-Zellen**

Die vorangegangenen Daten zeigten eine signifikante Herunterregulation der P-gp-Expression in Tlr2-defizienten Mäusen nach MTX-Exposition (Abb. 3.13 und Abb. 3.14). Daher wurde analysiert, ob der ABC-Transporter P-GP ein direktes Zielprotein im humanen TLR2-Signalweg ist. Weil P-GP vor allem in IEC exprimiert wird [66], wurden zunächst IEC auf mögliche Modulation der ABCB1/MDR1-Aktivität nach TLR2-Stimulation untersucht. Hierfür wurde der Rhodamine 123-Efflux ermittelt (Abb. 3.15). Es wurden Caco-2-Zellen gewählt, da diese als repräsentative IEC basal TLR2 exprimieren [17] und konstitutiv eine hohe P-GP-Expression aufweisen [72].



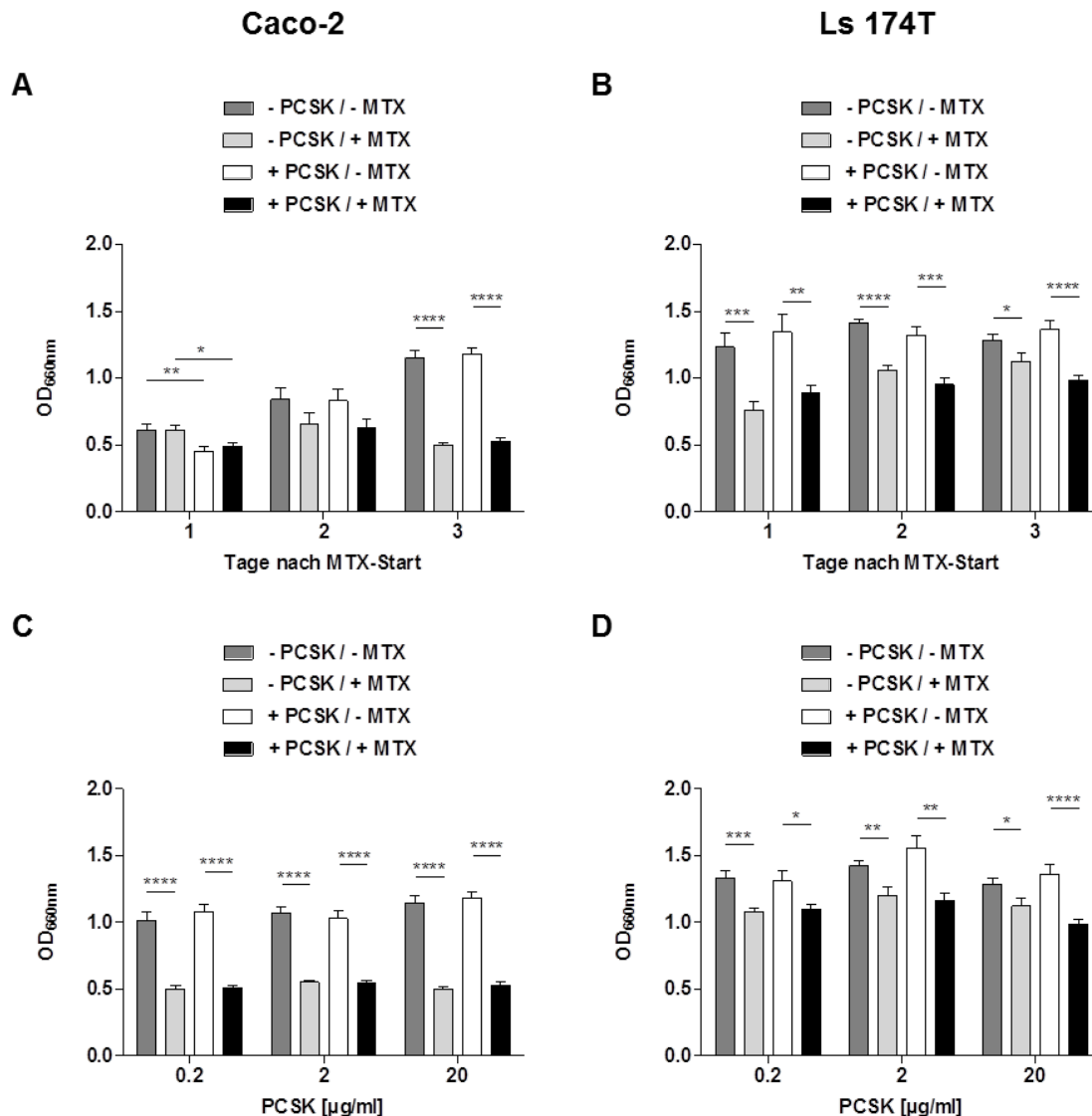
**Abb. 3.15: MDR-Efflux-Aktivität nach TLR2-Stimulation in IEC.**

Caco-2-Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit PCSK (20µg/ml) für 5min oder 24h behandelt. Die P-GP-Transportaktivität wurde mittels *Multidrug Resistance Direct Dye Efflux-Assay*, wie in *Material und Methoden* beschrieben, untersucht. Die Zellen wurden hierfür mit Rhodamine 123 für 1h auf Eis inkubiert. Nach einer 1-stündigen Efflux-Phase bei 37°C wurde die Immunfluoreszenz am Durchflusszytometer BD *FACSCanto™ II* gemessen. Tote Zellen wurden durch das Setzen von Gates mittels FSC/SSC bei der Auswertung ausgeschlossen. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von zwei unabhängigen Assays. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. ns: nicht signifikant.

Caco-2-Zellen, die entweder für 5min oder 24h mit PCSK stimuliert wurden, zeigten extra- bzw. intrazellulär die gleiche Menge des P-GP-Substrates Rhodamine 123 wie unbehandelte Caco-2-Zellen (Abb. 3.15). Dies bedeutet, dass die TLR2-Aktivierung durch PCSK-Stimulation die MDR1-Aktivität nicht funktionell beeinflusst.

### 3.3.1.2 Metabolische Aktivität in IEC

Caco-2-Zellen und eine weitere humane intestinale epitheliale Zelllinie, Ls 174T, wurden auf eine MTX-vermittelte Modulation der metabolischen Aktivität nach TLR2-Stimulation untersucht (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16: Metabolische Aktivität nach TLR2-Stimulation und MTX-Gabe in IEC.**

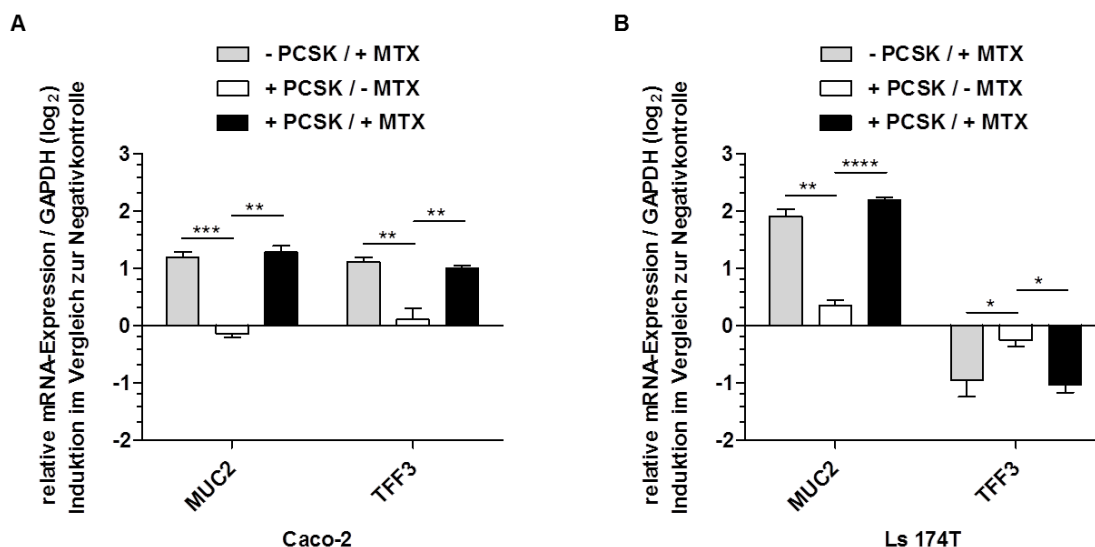
(A) Caco-2- und (B) Ls 174T-Zellen wurden für 24h mit PCSK (20µg/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen und mit MTX (10µM) oder Lösungsmittelkontrolle (0,9% NaCl) für 18, 42 oder 66h behandelt. (C + D) Die intestinalen Epithelzelllinien wurden mit PCSK (0,2 bis 20µg/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) für 24h behandelt, bevor sie nach einmaligen Waschen mit MTX (10µM) oder Lösungsmittelkontrolle (0,9% NaCl) für 66h inkubiert wurden. Die Messung der metabolischen Aktivität erfolgte anhand der Menge des gebildeten Formazans mittels *CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation-Assay*. Die Werte wurden bei 490nm und einer Referenzwellenlänge von 660nm am ELISA-Reader *ELx808* gemessen. Daten aus zwei unabhängigen Versuchen wurden zusammengefasst und als Mittelwert ± SEM dargestellt. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

Die metabolische Aktivität von Caco-2-Zellen war nach 66-stündiger Exposition mit hochdosiertem MTX (10 $\mu$ M) signifikant vermindert (Abb. 3.16 A). In Ls 174T-Zellen führte MTX bereits nach 18h zu einer deutlichen Reduktion des Stoffwechsels (Abb. 3.16 B).

Die MTX-induzierte Zytotoxizität wurde durch Prästimulation mit 20 $\mu$ g/ml PCSK für 24h nicht verhindert. In zusätzlichen Versuchen wurden verschiedene PCSK-Dosen getestet (0,2 $\mu$ g/ml und 2 $\mu$ g/ml), jedoch wurde kein protektiver Dosisseffekt festgestellt (Abb. 3.16 C und D).

### 3.3.1.3 Genexpression von Becherzellfaktoren in IEC

IEC (Caco-2- und Ls 174T-Zellen) wurden auf potenzielle Störungen der Becherzellfaktoren MUC2 (Mucin 2) und TFF3 auf mRNA-Genexpressionsebene nach MTX-Exposition untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss des TLR2-Signalweges analysiert (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17: Auswirkungen der TLR2-Stimulation und MTX-Gabe auf die mRNA-Genexpression von Becherzellfaktoren in IEC.**

(A) Caco-2- und (B) Ls 174T-Zellen wurden für 24h mit PCSK (20 $\mu$ g/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen und mit MTX (10 $\mu$ M) oder Lösungsmittelkontrolle (0,9% NaCl) für 66h behandelt. Die Proben wurden mittels qRT-PCR auf mRNA-Expression von MUC2 und TFF3 untersucht. Die Kopienzahl der Gene wurde für die Auswertung auf das *housekeeping*-Gen GAPDH bezogen. Die Expression der Gene wurde auf den Mittelwert der Expression der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle bezogen und als x-fache Induktion angegeben (log<sub>2</sub>-Einstellung). Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3 pro Gruppe). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

Caco-2-Zellen wiesen eine MTX-induzierte Hochregulation von MUC2- und TFF3-mRNA auf (Abb. 3.17 A). In Ls 174T-Zellen wurde MUC2-mRNA durch MTX-Gabe induziert (Abb. 3.17 B). Die TFF3-Genexpression zeigte hingegen ein inverses Bild; TFF3-mRNA wurde durch MTX inhibiert. MUC2 und TFF3 werden in Becherzellen exprimiert und stabilisieren die Mukusschicht zum Schutz des Darmlumens [151]. Die hier beobachtete abnormale Regulation der beiden Gene in Caco-2- und Ls 174T-Zellen deutet auf MTX-induzierte Zellschäden hin.

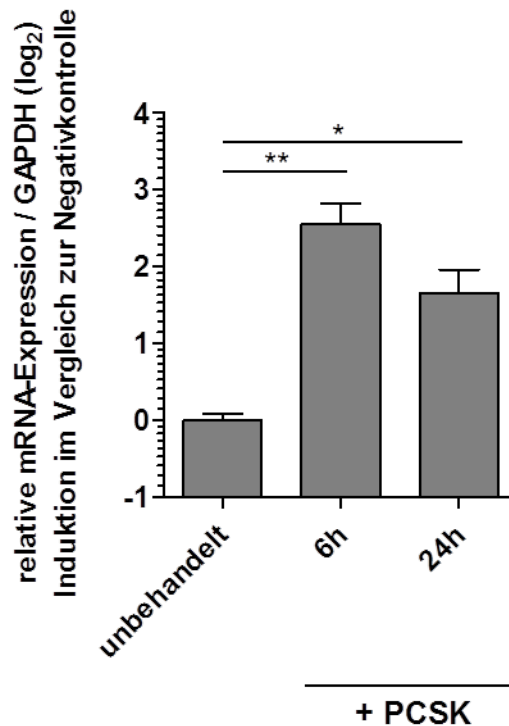
Die 24-stündige PCSK-Prästimulation beeinflusste die MTX-induzierte Modulation der MUC2- und TFF3-Genexpression in beiden IEC nicht.

### **3.3.2 Humane monozytäre Zellen**

Die Kolokalisation von Cd11b und P-gp in unbehandelten WT-Mäusen bewies, dass P-gp in der Lamina Propria insbesondere in Cd11b<sup>+</sup>-Zellen basal exprimiert wird (Abb. 3.14). Es wurde daraufhin untersucht, ob TLR2-Stimulation die Funktion von P-GP in CD11b<sup>+</sup>-myeloischen Zellen reguliert. Hierfür wurden CD11b<sup>+</sup>-THP-1-Zellen (Anhang Abb. 6.1) [200] exemplarisch eingesetzt, welche basal TLR2 und TLR4 wie auch das ABCB1/MDR1-kodierte P-GP [100] exprimieren.

### 3.3.2.1 P-GP-Expression

THP-1-Zellen wurden kurzzeitig mit PCSK (20µg/ml) stimuliert und die Regulation der ABCB1-Genexpression mittels qRT-PCR analysiert (Abb. 3.18).

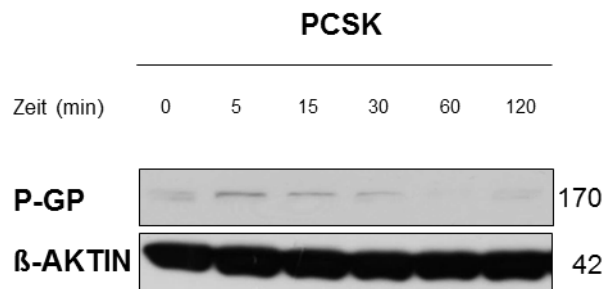


**Abb. 3.18: Zeitverlauf der ABCB1-mRNA-Expression nach PCSK-Stimulation in THP-1-Zellen.**

THP-1-Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit PCSK (20µg/ml) für 6h bzw. 24h behandelt. Die P-GP-Expression wurde mittels qRT-PCR analysiert (n=4 pro Gruppe). Die Ergebnisse wurden für die Auswertung auf das *housekeeping*-Gen GAPDH bezogen. Die Expression der Gene wurde auf den Mittelwert der Expression der unbehandelten THP-1-Zellen bezogen und als x-fache Induktion angegeben (log<sub>2</sub>-Einstellung). Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

Die Untersuchung der mRNA-Genexpression wies nach 6-stündiger Behandlung mit dem TLR2-Liganden eine signifikante Hochregulation von ABCB1 in THP-1-Zellen auf.

Abb. 3.19 zeigt den zeitabhängigen Einfluss der TLR2-Aktivierung auf die Proteinexpression von P-GP.



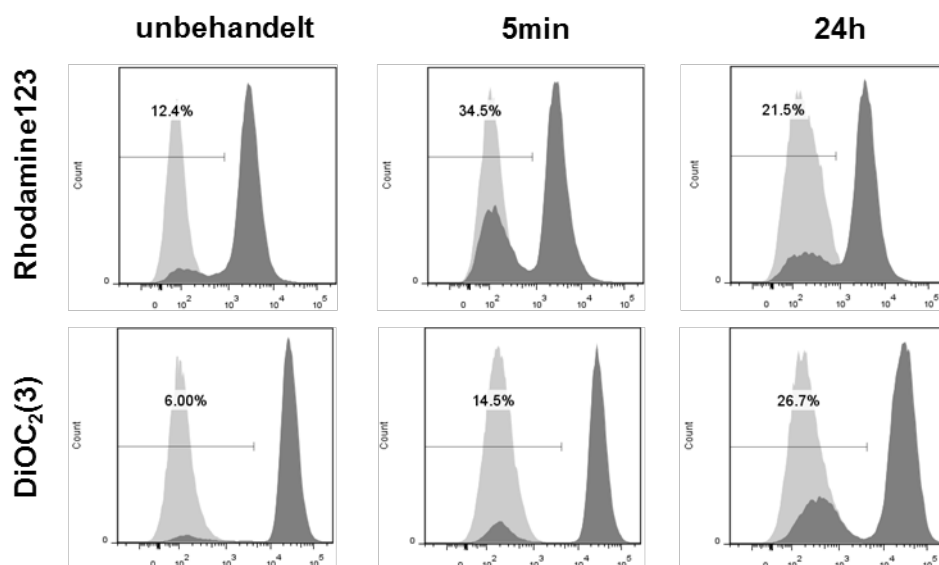
**Abb. 3.19: Zeitverlauf der P-GP-Proteinexpression nach PCSK-Stimulation in THP-1-Zellen.**

THP-1-Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit PCSK (20 µg/ml) für 5 bis 120 min behandelt. Die P-GP-Expression wurde mittels Western-Blot analysiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Bild von drei unabhängigen Versuchen. Der Blot wurde im Anschluss mit einem anti-β-AKTIN-Antikörper als Ladungskontrolle überprüft.

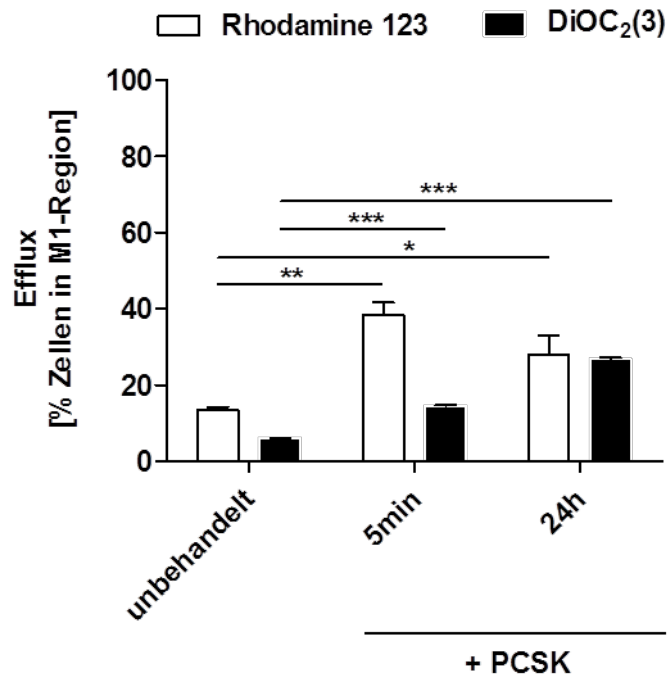
Es wurde eine sofortige Induktion der P-GP-Proteinexpression innerhalb von 5 min nach PCSK-Stimulation nachgewiesen, die jedoch innerhalb von 30 min bereits wieder nachließ (Abb. 3.19).

Anschließend wurde der Effekt der TLR2-Aktivierung auf die MDR1-Aktivität funktionell charakterisiert (Abb. 3.20). Hierfür wurde der intra- bzw. extrazelluläre Transport der beiden MDR1-Substrate Rhodamine 123 und DiOC<sub>2</sub>(3) [24] in THP-1-Zellen nach Stimulation mit PCSK per FACS bestimmt (Abb. 3.20).

**A**



B



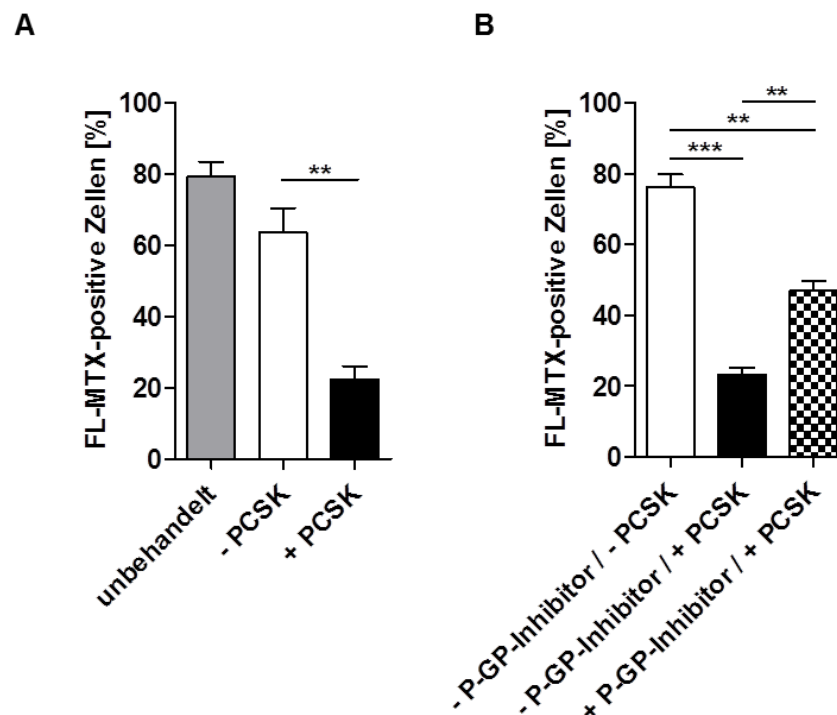
**Abb. 3.20: MDR-Efflux-Aktivität nach TLR2-Stimulation in THP-1-Zellen.**

THP-1-Zellen wurden entweder für 24h unbehandelt gelassen oder mit PCSK (20µg/ml) für 5min bzw. 24h stimuliert. Die P-GP-Transportaktivität wurde anhand des *Multidrug Resistance Direct Dye Efflux*-Assays, wie in *Material und Methoden* beschrieben, gemessen. Hierfür wurden die Zellen entweder mit Rhodamine 123 für 1h auf Eis oder mit DiOC<sub>2</sub>(3) für 15min auf Eis behandelt. Nach jeweils einer 1-stündigen Efflux-Phase bei 37°C wurde die Immunfluoreszenz am Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II gemessen. Tote Zellen wurden durch das Setzen von Gates mittels FSC/SSC bei der Auswertung ausgeschlossen. (A) Der Efflux wurde in Relation zu der Zellzahl in der M1-Region (geringe Fluoreszenz; hellgraue Region) bezogen auf die Gesamtzellzahl quantifiziert. Dargestellt ist eine repräsentative Auswertung von mindestens zwei unabhängigen Versuchen. (B) Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von zwei bis drei unabhängigen Assays. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

Der Efflux der beiden P-GP-Substrate stieg in PCSK-stimulierten THP-1-Zellen im Vergleich zu unbehandelten THP-1-Zellen deutlich an (Abb. 3.20). Die mit ca. 40% höchste Rhodamine 123-Effluxrate wurde bereits nach 5-minütiger TLR2-Aktivierung gemessen, die von DiOC<sub>2</sub>(3) nach 24h (ca. 30%).

Im Anschluss wurde untersucht, ob die PCSK-Behandlung zur direkten zellulären Ausschleusung von MTX in THP-1-Zellen führt. Dafür wurden THP-1-Zellen für 21h mit FL-MTX beladen und dann für 3h mit PCSK stimuliert (Abb. 3.21).





**Abb. 3.21: P-GP-abhängiger Efflux von FL-MTX nach TLR2-Stimulation in THP-1-Zellen.**

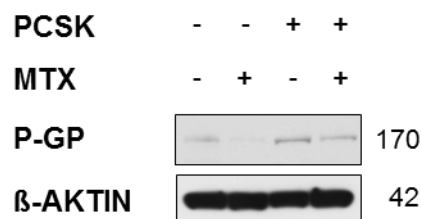
(A) THP-1-Zellen wurden mit FL-MTX (10 $\mu$ M) oder unmarkiertem MTX (10 $\mu$ M) als Negativkontrolle für 21h behandelt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit PCSK (20 $\mu$ g/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) für 3h inkubiert. Für den Nachweis des FL-MTX wurde die Fluoreszenz am Durchflusszytometer BD *FACSCanto™ II* ausgewertet. Dargestellt ist die prozentuale Anzahl der FL-MTX<sup>+</sup>-Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von zwei bis vier unabhängigen Versuchen. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*p < 0,01. (B) THP-1-Zellen wurden mit dem spezifischen P-GP-Inhibitor C-4 (10 $\mu$ M) oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) für 15min und für weitere 5min zusätzlich mit PCSK (20 $\mu$ g/ml) behandelt, um den TLR2-vermittelten MTX-Efflux zu inhibieren. Nach einmaligen Waschen wurden die Zellen mit FL-MTX (10 $\mu$ M) oder unmarkiertem MTX (10 $\mu$ M) für 21h inkubiert. Die Fluoreszenz wurde am Durchflusszytometer BD *FACSCanto™ II* gemessen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der FL-MTX<sup>+</sup>-Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von drei unabhängigen Versuchen. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

Aktivierung des TLR2-Signalweges durch PCSK führte zum spontanen extrazellulären Transport von MTX: Während in der Lösungsmittelkontrolle ca. 60% der Zellen FL-MTX<sup>+</sup> waren, wurde FL-MTX nur noch in ca. 20% der PCSK-behandelten THP-1-Zellen ermittelt (Abb. 3.21 A).

Obwohl MTX oft als P-GP-Substrat beschrieben wurde [34, 166], wird es auch von anderen Transportern (wie z.B. durch Abcc1 und Abcc2 [112]) reguliert. Um den P-GP-abhängigen Effekt via TLR2 zu beweisen, wurde der spezifische Inhibitor C-4 zur Blockade von P-GP eingesetzt. Die deutliche Reduktion des TLR2-induzierten MTX-Effluxes von fast 25% durch Prästimulation der THP-1-Zellen mit dem P-GP-

Inhibitor legte nahe (Abb. 3.21 B), dass die TLR2-Aktivierung die Ausschleusung von MTX zumindest teilweise beschleunigt.

Als nächstes wurde der Einfluss von MTX auf die P-GP-Proteinexpression nach PCSK-Stimulation im Western-Blot untersucht (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22: Proteinexpression von P-GP nach TLR2-Stimulation und MTX-Gabe in THP-1-Zellen.** THP-1-Zellen wurden mit PCSK (20µg/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) für 24h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen und mit MTX (10µM) oder Lösungsmittelkontrolle (0,9% NaCl) für 66h behandelt. Mittels Western-Blot wurde die P-GP-Proteinexpression untersucht. Der Blot wurde im Anschluss mit einem anti-β-AKTIN-Antikörper als Ladungskontrolle überprüft. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von vier unabhängigen Versuchen.

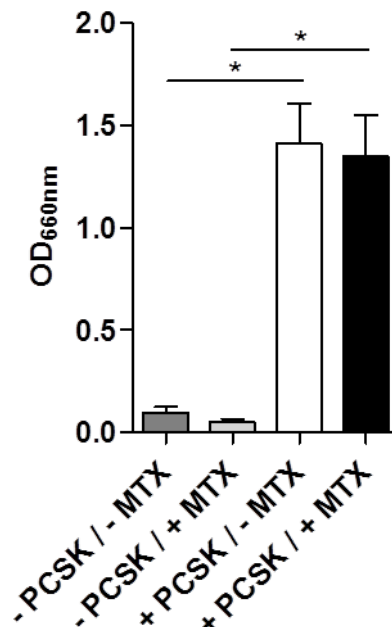
Wie bereits in Abb. 3.19 gezeigt, führte die alleinige, kurzzeitige Stimulation mit dem TLR2-Liganden PCSK (5min, 15min) zu einer Hochregulation des basal gering exprimierten P-GP. Eine Modulation der Proteinexpression durch TLR2-Aktivierung mit einer 30- bis 120-minütigen Dauer wurde nicht nachgewiesen. Jedoch wird in Abb. 3.22 veranschaulicht, dass eine 24-stündige PCSK-Behandlung erneut die P-GP-Proteinexpression induzierte. MTX-Exposition führte zu einem kompletten Verlust der P-GP-Proteinexpression, der jedoch durch die präventive PCSK-Behandlung verhindert wurde.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, dass die Aktivierung des TLR2-Signalweges die Expression und die funktionelle Aktivität von ABCB1/MDR1 in monozytären Zellen zu regulieren vermag. Zudem wurde MTX mittels P-GP nach PCSK-Stimulation aktiv aus myeloischen Zellen ausgeschleust, sodass eine Akkumulation des Chemotherapeutikums in der Zelle verhindert wurde.

### 3.3.2.2 Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1

Es wurde beschrieben, dass MTX die Aktivierung von NF-κB hemmt [113]. Daher wurde als nächstes die funktionelle Aktivität der beiden Transkriptionsfaktoren NF-κB

und AP-1 nach PCSK-Stimulation in MTX-behandelten THP-1-XBlue™-MD-2-CD14-Zellen analysiert (Abb. 3.23).



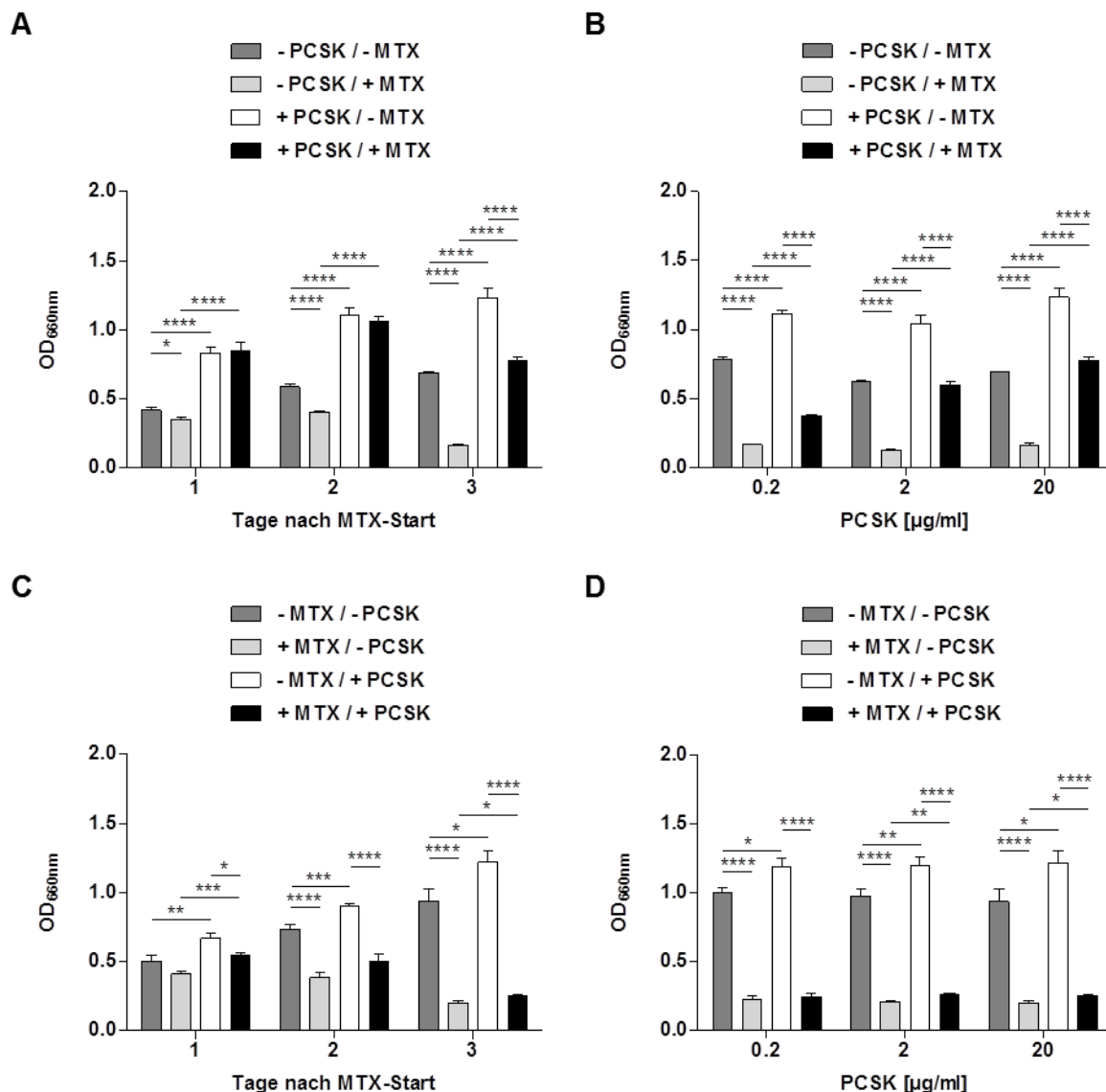
**Abb. 3.23: Nachweis der TLR2-Signalweg-Aktivierung mittels SEAP-Assay nach PCSK- und MTX-Gabe in THP-1-Zellen.**

THP-1-Zellen wurden mit PCSK (20µg/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) für 24h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen und mit MTX (10µM) oder Lösungsmittelkontrolle (0,9% NaCl) für 66h behandelt. Für die Positivkontrolle wurden über den gesamten Zeitraum THP-1-Zellen mit LPS (1µg/ml) und für die Negativkontrolle mit Wasser behandelt (Daten nicht gezeigt). Die TLR2-Aktivierung wurde mittels SEAP-Assay bestimmt. Hierfür wurde der Überstand der Proben mit *Quanti-Blue™* versetzt und der Farbumschlag nach 2h durch Messung der optischen Dichte bei 660nm im ELISA-Reader *ELx808* gemessen. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von zwei unabhängigen Ergebnissen. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. \*p < 0,05.

MTX-Gabe hatte in THP-1-Zellen keinen signifikanten Effekt auf die NF-κB- und AP-1-Aktivität (Abb. 3.23). Die PCSK-Vorbehandlung führte zu einer deutlichen Hochregulation der beiden Transkriptionsfaktoren, welche nicht durch die spätere MTX-Gabe beeinflusst wurde.

### 3.3.2.3 Metabolische Aktivität

Cutolo *et al.* zeigten, dass MTX zytotoxisch auf THP-1-Zellen wirkt [32]. Daher wurde überprüft, ob der apoptotische Effekt des Chemotherapeutikums in THP-1-Zellen durch prophylaktische PCSK-Behandlung gehemmt wird. Hierfür wurde die metabolische Aktivität nach MTX-Gabe mittels MTS-Assay analysiert (Abb. 3.24).



**Abb. 3.24: Metabolische Aktivität nach TLR2-Stimulation und MTX-Gabe in THP-1-Zellen.**

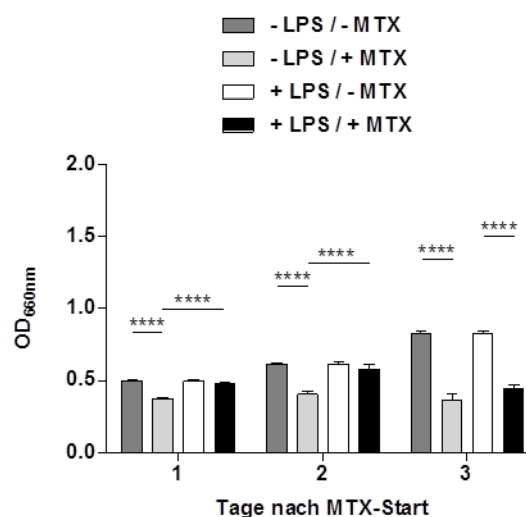
(A) THP-1-Zellen wurden mit PCSK (20µg/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) für 24h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen und mit MTX (10µM) oder Lösungsmittelkontrolle (0,9% NaCl) für 18, 42 oder 66h behandelt. (B) Die Zellen wurden mit PCSK (0,2 bis 20µg/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) für 24h behandelt, bevor sie nach einmaligen Waschen mit MTX (10µM) oder Lösungsmittelkontrolle (0,9% NaCl) für 66h inkubiert wurden. (C) THP-1-Zellen wurden zunächst für 18h bis 66h mit MTX (10µM) oder Lösungsmittelkontrolle (0,9% NaCl) behandelt, bevor sie einmal gewaschen und mit PCSK (20µg/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) für 24h inkubiert wurden. (D) Die MTX-Behandlung (10µM) von THP-1-Zellen erfolgte für 66h. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen mit PCSK (0,2 bis 20µg/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) für 24h stimuliert. Die Messung der metabolischen Aktivität nach jeweiliger Behandlung erfolgte anhand der Menge des gebildeten Formazans mittels *CellTiter 96® AQ<sub>UEOUS</sub> One Solution Cell Proliferation-Assay*. Die Werte wurden bei 490nm und einer Referenzwellenlänge von 660nm am ELISA-Reader *ELx808* gemessen. Daten aus zwei unabhängigen Versuchen wurden zusammengefasst und als Mittelwert ± SEM dargestellt. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

In Abb. 3.24 A wurde eine erhöhte Zytotoxizität ab einer 18-stündigen MTX-Gabe gezeigt. THP-1-Zellen wiesen hingegen nach alleiniger PCSK-Vorbehandlung zu

allen gemessenen Zeitpunkten eine gesteigerte metabolische Aktivität auf. Eine nachfolgende 18- bzw. 42-stündige MTX-Gabe führte in THP-1-Zellen zu keiner Reduktion der PCSK-induzierten Stoffwechselaktivität. Erst nach einer MTX-Gabe von 66h wurde die Induktion der metabolischen Aktivität trotz prophylaktischer PCSK-Behandlung in geringem Maße unterbunden. Die 24-stündige Behandlung mit niedrigen PCSK-Konzentrationen (0,2µg/ml und 2µg/ml) schützte THP-1-Zellen bereits vor metabolischer Suppression unter MTX (Abb. 3.24 B).

Des Weiteren wurde untersucht, ob die reverse Stimulation mit PCSK einen therapeutischen Effekt auf die MTX-induzierte Hemmung der metabolischen Aktivität hat. Hierfür wurden THP-1-Zellen zunächst mit MTX behandelt und anschließend mit PCSK stimuliert (Abb. 3.24 C). Unabhängig von der Dosis konnte die konsekutive Therapie mit PCSK die MTX-induzierte Zytotoxizität jedoch nicht verhindern (Abb. 3.24 D).

Um zu untersuchen, ob der protektive Effekt auch durch andere TLR vermittelt wird, wurde exemplarisch der TLR4-Ligand LPS als Kontrolle eingesetzt (Abb. 3.25).



**Abb. 3.25: Metabolische Aktivität nach TLR4-Stimulation und MTX-Gabe in THP-1-Zellen.**

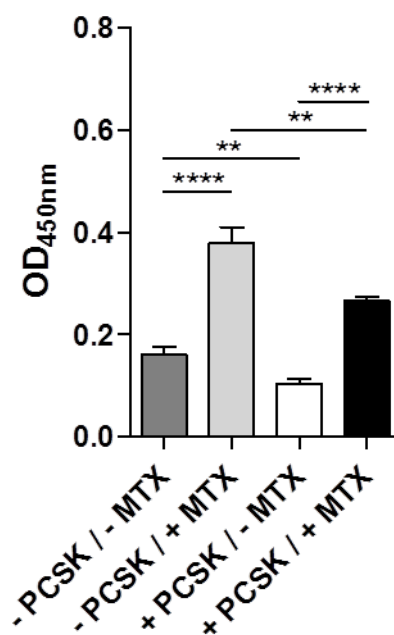
THP-1-Zellen wurden mit LPS (1µg/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) für 24h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen und mit MTX (10µM) oder Lösungsmittelkontrolle (0,9% NaCl) für 18, 42 oder 66h behandelt. Die Messung der metabolischen Aktivität erfolgte anhand der Menge des gebildeten Formazans mittels *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation-Assay*. Die Werte wurden bei 490nm und einer Referenzwellenlänge von 660nm am ELISA-Reader *ELx808* gemessen. Daten aus zwei unabhängigen Versuchen wurden zusammengefasst und als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*\*\*p < 0,0001.

Die Behandlung der THP-1-Zellen mit dem TLR4-Agonisten beeinflusste im Gegensatz zu PCSK die MTX-induzierte Suppression des Stoffwechsels nicht (Abb. 3.25).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die präventive Aktivierung des TLR2-Signalweges spezifisch die MTX-induzierte Zytotoxizität in THP-1-Zellen abmildert.

### 3.3.2.4 Laktatdehydrogenase-Aktivität

Neben ihrer metabolischen Aktivität wurden THP-1-Zellen auf Schäden der Plasmamembran nach MTX-Gabe und der Einfluss des TLR2-Signalweges untersucht. Hierbei wurde die Menge des extrazellulär ausgeschütteten LDH detektiert (Abb. 3.26).



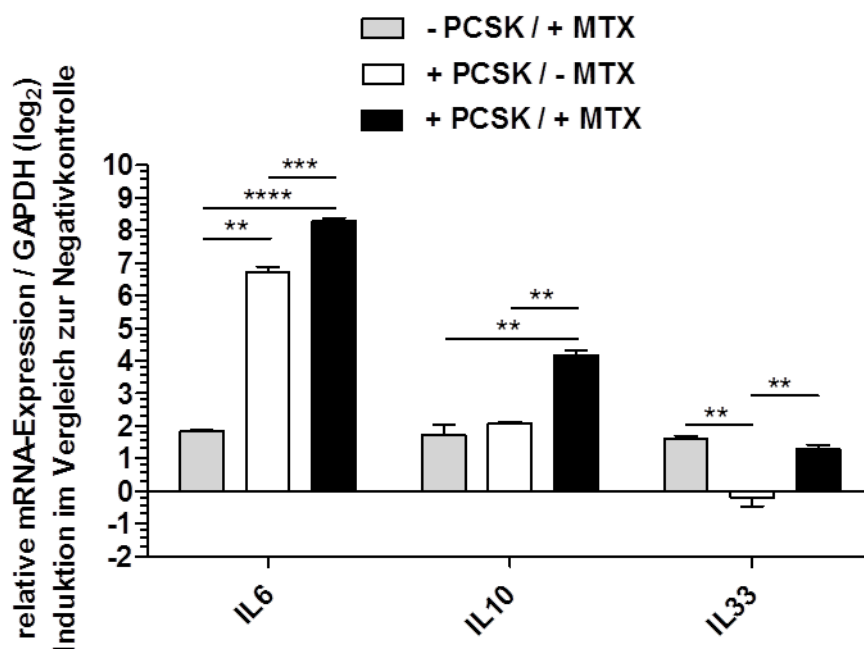
**Abb. 3.26: Funktionelle Auswirkungen der TLR2-Stimulation auf MTX-induzierte Zytotoxizität in THP-1-Zellen.**

THP-1-Zellen wurden mit PCSK (20µg/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) für 24h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen und mit MTX (10µM) oder Lösungsmittelkontrolle (0,9% NaCl) für 66h behandelt. Zum Nachweis der Zytotoxizität mittels LDH-Assay wurde die optische Dichte bei 450nm und einer Referenzwellenlänge von 660nm direkt im Anschluss am ELISA-Reader *ELx808* bestimmt. Der Graph zeigt ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche, wobei die Proben jeweils im Sechsfachansatz angesetzt wurden. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*p < 0,01; \*\*\*\*p < 0,0001.

Abb. 3.26 zeigte anhand der gestiegenen LDH-Freisetzung einen MTX-induzierten Rückgang der Vitalität in THP-1-Zellen. Die präventive Aktivierung des TLR2-Signalweges verhinderte die MTX-induzierte Membranintegrität-Störung.

### 3.3.2.5 Genexpression

Weiterhin wurde der Effekt von MTX auf die mRNA-Genexpression von pro- und anti-inflammatorisch-wirkenden Zytokinen in THP-1-Zellen nach PCSK-Vorstimulation analysiert (Abb. 3.27).



**Abb. 3.27: mRNA-Genexpression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen nach TLR2-Stimulation und MTX-Gabe in THP-1-Zellen.**

THP-1-Zellen wurden mit PCSK (20µg/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) für 66h stimuliert. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen mit MTX (10µM) oder Lösungsmittelkontrolle (0,9% NaCl) für 66h behandelt. Anschließend wurden die Proben in qRT-PCR auf mRNA-Expression der pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen IL6, IL10 und IL33 untersucht. Die Kopienzahl der Marker wurde für die Auswertung auf das *housekeeping*-Gen GAPDH bezogen. Die Expression der Gene wurde auf den Mittelwert der Expression der Lösungsmittelkontrolle bezogen und als x-fache Induktion angegeben (log<sub>2</sub>-Einstellung). Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt (n=3 pro Gruppe). \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

Bisher wurde beschrieben, dass die durch Chemotherapeutika-induzierte Mukositis zu einer erhöhten IL6-Produktion im Darm von Mäusen führt [226]. Ebenso wurde eine erhöhte IL6-Aktivität bei Patienten mit Morbus Crohn festgestellt [119]. Es wird vermutet, dass IL6 eine pleiotrope Rolle bei der Entwicklung von Entzündungen

besitzt. Die in Abb. 3.27 dargestellte erhöhte IL6-mRNA-Genexpression in MTX-behandelten THP-1-Zellen, in denen eine verringerte metabolische Aktivität nachgewiesen wurde (Abb. 3.24), wies ebenfalls darauf hin. PCSK-Vorbehandlung führte zur IL6-Induktion, die durch die nachfolgende MTX-Behandlung additiv anstieg.

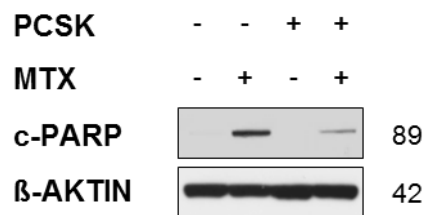
Die protektive Wirkung von IL10 bei Entzündungen wurde durch de Koning *et al.* bewiesen [36]: IL10 KO-Mäuse erkrankten nach MTX-Gabe im Gegensatz zu unbehandelten IL10 KO Mäusen an akuter Mukositis. THP-1-Zellen exprimierten möglicherweise aufgrund der schützenden Funktion von IL10 das TH2-Zytokin nach Chemotherapie höher (Abb. 3.27). Die alleinige TLR2-Aktivierung durch PCSK induzierte ebenfalls die IL10-mRNA-Genexpression. Wurden THP-1-Zellen nach Aktivierung des TLR2-Signalweges mit MTX behandelt, wurde eine zweifachhohe Regulation der IL10-mRNA-Genexpression gezeigt.

Der Verlust von IL33 führte im Gegensatz zur IL10-Defizienz zu einer abgemilderten Chemotherapie (Irinotecan)-verursachten Mukositis [62]. Zusätzlich zeigten Cayrol und Girard, dass nekrotische Zellen IL33 exprimieren [22]. Diese beiden Beobachtungen korrelieren mit der erhöhten mRNA-Genexpression von IL33 (Abb. 3.27) bei MTX-vermittelter Zytotoxizität (Abb. 3.24) in THP-1-Zellen. PCSK-Behandlung hatte auf die MTX-vermittelte Regulierung von IL33-mRNA keinen signifikanten Einfluss.

### 3.3.2.6 Proteinexpression

In Abb. 3.24 und Abb. 3.26 ist zu sehen, dass MTX zytotoxisch auf THP-1-Zellen wirkt. Um den apoptotischen Effekt des Chemotherapeutikums auf Protein-Ebene zu beweisen, wurde zunächst die proteolytische Spaltung von PARP (Poly (ADP-Ribose)-Polymerase) untersucht. Bei Apoptose wird PARP in ein kleines und ein großes Fragment gespalten [86]. Während das kleinere Fragment die DNA-bindende Domäne besitzt, stellt das große Fragment die katalytische Domäne dar. Die MTX-induzierte Zytotoxizität wurde hier anhand des größeren Fragments analysiert (Abb. 3.28).



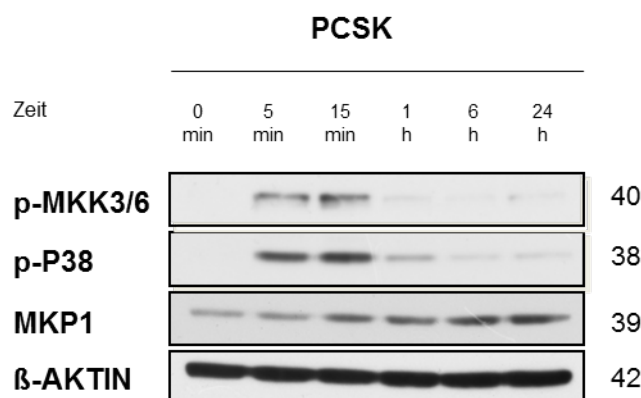


**Abb. 3.28: Proteinexpression von Cleaved-PARP nach TLR2-Stimulation und MTX-Gabe in THP-1-Zellen.**

THP-1-Zellen wurden mit PCSK (20µg/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) für 24h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen und mit MTX (10µM) oder Lösungsmittelkontrolle (0,9% NaCl) für 66h behandelt. Mittels Western-Blot wurde die Proteinexpression von Cleaved-PARP als Marker für Apoptose untersucht. Der Blot wurde im Anschluss mit einem anti-β-AKTIN-Antikörper als Ladungskontrolle überprüft. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen.

Die alleinige MTX-Exposition führte zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate (Abb. 3.28). Die Chemotherapeutikum-verursachte PARP-Spaltung wurde jedoch durch Prästimulation mit dem TLR2-Liganden PCSK gehemmt.

Phong *et al.* zeigten, dass die Aktivierung von P38-MAPK vor Genotoxizität schützt [147]. Daher wurde als nächstes analysiert, ob der TLR2-Agonist PCSK den P38-MAPK-Signalweg in THP-1-Zellen induziert (Abb. 3.29).



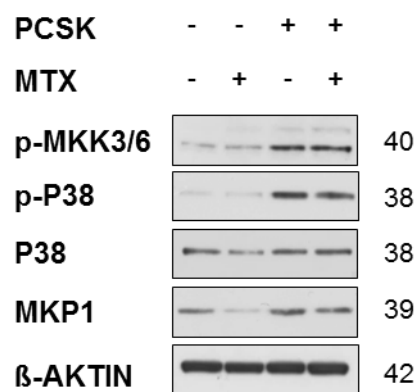
**Abb. 3.29: Zeitabhängige Aktivierung des P38-MAPK-Signalweges nach TLR2-Stimulation in THP-1-Zellen.**

THP-1-Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit PCSK (20µg/ml) für 5min bis 24h stimuliert. Die Zellen wurden mittels Western-Blot hinsichtlich der Mediatoren des P38-MAPK-Signalweges untersucht. Der Blot wurde im Anschluss mit einem anti-β-AKTIN-Antikörper als Ladungskontrolle überprüft. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

Die Stimulation mit PCSK führte bereits binnen 5min zu einer Phosphorylierung von MKK3/MKK6-MAPK und P38-MAPK (Abb. 3.29). Nach 1h war die PCSK-induzierte Aktivierung der MAPK auf die ursprüngliche Ausgangsexpression zurückgegangen.

Dies könnte mit der Induktion der Proteinexpression von MKP1 nach 15-minütiger PCSK-Behandlung begründbar sein. Denn aktives MKP1 wirkt als Negativregulator von P38-MAPK [25]. Die PCSK-vermittelte Stimulation von MKP1 war 24h nachweisbar.

Anschließend wurde der Einfluss von MTX auf die PCSK-induzierte Modulation des P38-MAPK-Signalweges untersucht (Abb. 3.30).



**Abb. 3.30: Modulation des P38-MAPK-Signalweges nach TLR2-Stimulation und MTX-Gabe in THP-1-Zellen.**

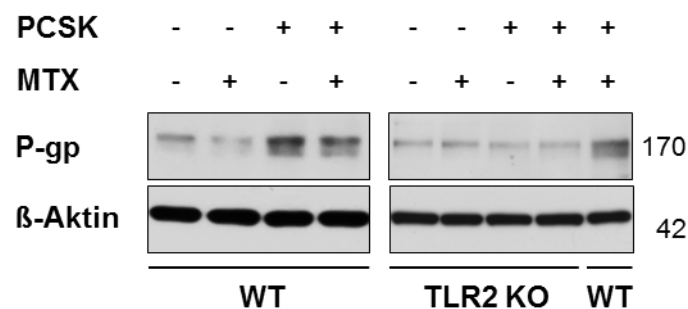
THP-1-Zellen wurden mit PCSK (20µg/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) für 24h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen und mit MTX (10µM) oder Lösungsmittelkontrolle (0,9% NaCl) für 66h behandelt. Mittels Western-Blot wurde die Proteinexpression der Mediatoren des P38-MAPK-Signalweges untersucht. Der Blot wurde im Anschluss mit einem anti-β-AKTIN-Antikörper als Ladungskontrolle überprüft. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

Die alleinige MTX-Gabe führte nicht zur Aktivierung des P38-Signalweges in THP-1-Zellen (Abb. 3.30). Nach 24-stündiger PCSK-Induktion waren MKK3/MKK6-MAPK und P38-MAPK, unabhängig von einer konsekutiven Behandlung mit dem Chemotherapeutikum, signifikant phosphoryliert. Die durch MTX-Exposition verursachte Herunterregulation von MKP1 wurde durch Aktivierung des TLR2-Signalweges mit PCSK unterbunden.

Zusammengefasst legten die Ergebnisse nahe, dass TLR2-Stimulation den P38-MAPK-Signalweg aktiviert, der möglicherweise so die MTX-induzierte Genotoxizität und den assoziierten Zelltod via MKP1 verhinderte.

### 3.4 Tlr2-abhängige P-gp-Expression in murinen myeloischen Zellen

Im Abschnitt 3.3.2.1 wurde gezeigt, dass die MTX-induzierte Inhibierung der P-GP-Aktivität durch PCSK-Behandlung in myeloischen THP-1-Zellen unterbunden wurde. Als nächstes wurde untersucht, ob die P-gp-Proteinexpression durch PCSK- und MTX-Stimulation in primären, myeloischen Zellen moduliert wird. Hierfür wurden myeloische Cd11b<sup>+</sup>-Zellen aus den Hinterbeinen von WT- und TLR2 KO-Mäusen isoliert und die P-gp-Proteinexpression mittels Western-Blot untersucht (Abb. 3.31).



**Abb. 3.31: TLR2-abhängige Proteininduktion des Transporters P-gp trotz MTX-Gabe in murinen CD11b<sup>+</sup>-Zellen.**

CD11b<sup>+</sup>-Zellen wurden aus dem Knochenmark von unbehandelten WT- und TLR2 KO-Mäusen, wie in *Material und Methoden* beschrieben, isoliert. Die myeloischen Zellen wurden für 3h mit PCSK (20µg/ml) oder Lösungsmittelkontrolle (Wasser) inkubiert. Anschließend wurden die CD11b<sup>+</sup>-Zellen einmal gewaschen und für 21h mit MTX (10µM) oder Lösungsmittelkontrolle (0,9% NaCl) behandelt. Mittels Western-Blot wurde die P-gp-Expression untersucht. Der Blot wurde im Anschluss mit einem anti-β-Aktin-Antikörper als Ladungskontrolle überprüft. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

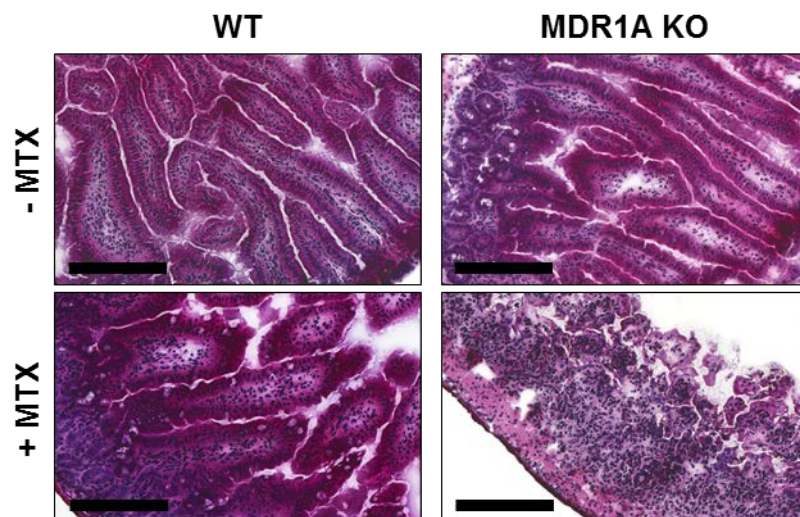
Ähnlich wie in THP-1-Zellen (Abb. 3.22) wurde die basal-niedrige P-gp-Proteinexpression in Cd11b<sup>+</sup>-Zellen der WT-Mäuse durch MTX-Gabe inhibiert. Nach Tlr2-Aktivierung war eine erhöhte Proteinexpression nachweisbar, die nicht wesentlich durch die nachfolgende MTX-Gabe beeinflusst wurde. Hingegen wurde die P-gp-Proteinexpression in Cd11b<sup>+</sup>-Zellen von TLR2 KO-Mäusen durch PCSK-Behandlung nicht moduliert; dies deutete darauf hin, dass die Hochregulation von P-gp Tlr2-abhängig ist.

### 3.5 Mdr1a-Abhängigkeit bei MTX-induzierter intestinaler Mukositis

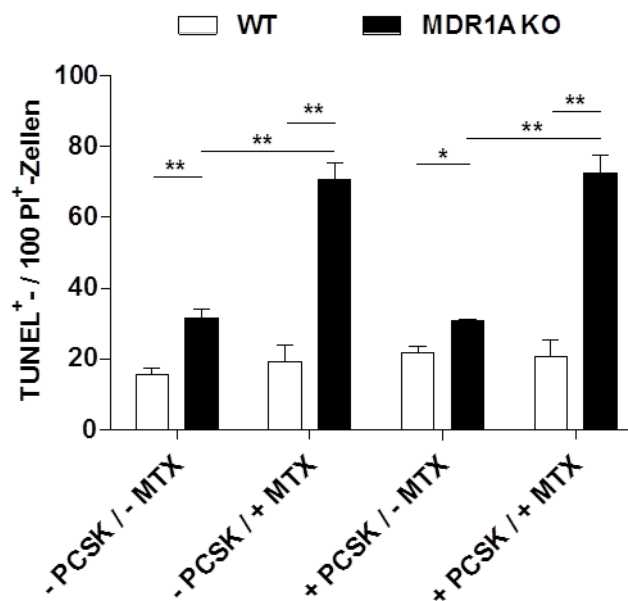
#### 3.5.1 Histopathologie und Zytotoxizität bei Mdr1a-Defizienz

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurde im Folgenden untersucht, ob die Tlr2-induzierte Suppression der Zytotoxizität nach MTX-Gabe hauptsächlich durch den Abc-Transporter P-gp reguliert wird. WT- und MDR1 KO-Mäuse wurden für vier Tage mit dem Chemotherapeutikum, wie in *Material und Methoden* beschrieben, behandelt. Nach Organentnahme an Tag 6 wurde der Grad der Entzündungsaktivität im proximalen Jejunum von Mdr1a-defizienten Mäusen und WT-Kontrollmäusen im FVB/N-Hintergrund histopathologisch bewertet (Abb. 3.32 A).

A



B



**Abb. 3.32: Mdr1a-Abhängigkeit des Tlr2-vermittelten protektiven Effektes auf MTX-induzierte intestinale Mukositis im proximalen Jejunum.**

(A) WT [FVB/N]- und MDR1A KO-Mäuse im Alter von durchschnittlich neun Wochen wurden *i.p.* mit oder ohne MTX (40mg/kg Körpergewicht) einmal täglich für vier Tage behandelt. An Tag 6 erfolgte die Organentnahme. Gefrierschnitte des proximalen Jejunums wurden mit H/E angefärbt (n=3-4 pro Gruppe) und am Aperio ScanScope®-System dokumentiert (Maßstabsbalken 200µm). (B) Der Dünndarm von WT- und MDR1A KO-Mäusen wurde entnommen und, wie in *Material und Methoden* beschrieben, *ex-vivo* kultiviert. Der Dünndarm wurde für 30min mit oder ohne PCSK (20µg/ml) und anschließend mit oder ohne MTX (10µM) für 4h behandelt. Nach Behandlung wurde der Dünndarm in *Tissue-TEK® O.C.T.-Compound* eingebettet. Gefrierschnitte wurden auf Apoptose mittels TUNEL-Assay untersucht. Dargestellt ist die Anzahl der TUNEL<sup>+</sup>-Zellen pro 100 PI<sup>+</sup>-Zellen. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von drei unabhängigen Versuchen. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

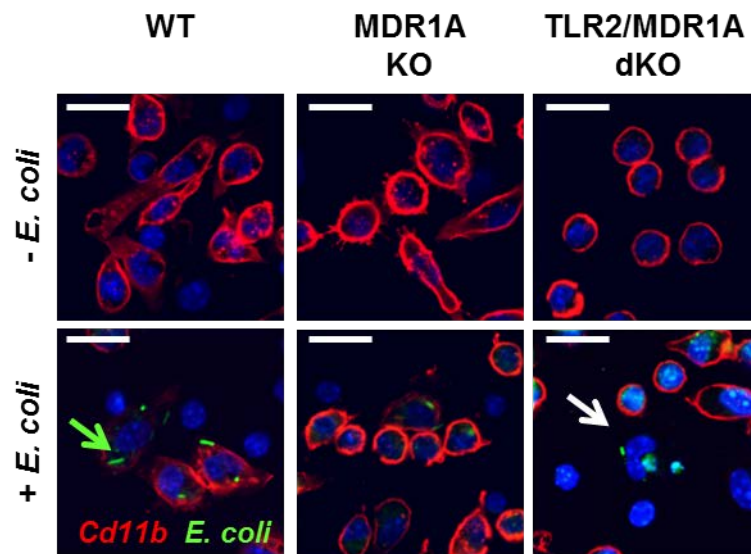
Im Gegensatz zu WT-Mäusen wiesen MDR1A KO-Mäuse nach MTX-Gabe eine hochgradige intestinale Mukositis mit Verlust der Becherzellen und mukosalen Erosionen auf (Abb. 3.32 A). Zusätzlich kam es zu Kryptenhypoplasie und Villusatrophie. Inflammatorische Infiltrate waren bis in die Submukosa nachweisbar. Die MTX-induzierte Mukositis war im proximalen Jejunum von MDR1A KO-Mäusen sogar noch ausgeprägter als bei Tlr2-defizienten Mäusen (Abb. 3.3). MTX-Gabe führte in FVB/N-WT-Kontrollmäusen, wie bereits auch in WT-Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund (Abb. 3.3), zu keiner Mukositis. Unbehandelte MDR1A KO-Kontrollmäuse wiesen eine unauffällige Morphologie des proximalen Jejunums auf.

Aufgrund der erhöhten Morbidität der MTX-behandelten MDR1A KO-Mäuse wurde der Einfluss der Tlr2-Aktivierung auf MTX-induzierte Zytotoxizität im *ex-vivo*-kultivierten Dünndarm der beiden unbehandelten Mausstämme nachfolgend

untersucht. Nach MTX-Exposition wurde in der Dünndarm-Mukosa der Mdr1a-defizienten Mäuse eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen nachgewiesen (Abb. 3.32 B). Prästimulation mit PCSK verhinderte den MTX-induzierten Zelltod in Mdr1a-defizienten intestinalen Mukosazellen jedoch nicht. Im Vergleich hatte, wie auch bereits im *in-vivo*-Modell gezeigt (Abb. 3.32 A), die MTX-Gabe funktionell keinen zytotoxischen Einfluss auf die Dünndarm-Mukosa von WT-Mäusen. Zu erwähnen ist, dass bei der *ex-vivo*-Kultivierung bereits basal ein erhöhter Zelltod in intestinalen Mukosazellen von MDR1A KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen festgestellt wurde. *Ex-vivo*-Kultivierung von primären Darmepithelzellen führt generell zu erhöhtem Zellstress. Daher kann eine Mdr1a-Defizienz im proximalen Jejunum möglicherweise eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Stress-induzierten Schaden verursachen. Diese Beobachtung korreliert mit den publizierten Daten von Smyth *et al.*, Stress führe bei P-gp-Verlust zu erhöhter Zytotoxizität [178].

### 3.5.2 Wirkung von *E. coli* auf TLR2/MDR1A dKO-Cd11b<sup>+</sup>-Zellen

In Kapitel 3.2.1 wurde gezeigt, dass bei Tlr2-Defizienz der LPS-Signalweg mittels Md-2/Tlr4 in der Pathogenese der MTX-induzierten intestinalen Mukositis eine entscheidende Rolle spielt. Zudem wurde bereits durch unsere Arbeitsgruppe bewiesen, dass der Verlust von Tlr2 in Mdr1a-defizienten Mäusen auch zu einer erhöhten Md-2-Aktivierung führt [44]. Aufgrund dessen wurde analysiert, welchen funktionellen Einfluss LPS auf Cd11b<sup>+</sup>-myeloische Zellen bei gleichzeitiger Tlr2- und Mdr1a-Defizienz hat [44] (Abb. 3.33). Zur funktionellen Analyse wurden Cd11b<sup>+</sup>-Makrophagen mit nicht-pathogenen *E. coli*, deren Zellmembran sich unter anderem aus LPS zusammensetzt, behandelt. Hierfür wurden Peritonealmakrophagen verwendet, da das murine Peritoneum eine hohe Anzahl an leicht zu mobilisierenden Makrophagen besitzt.

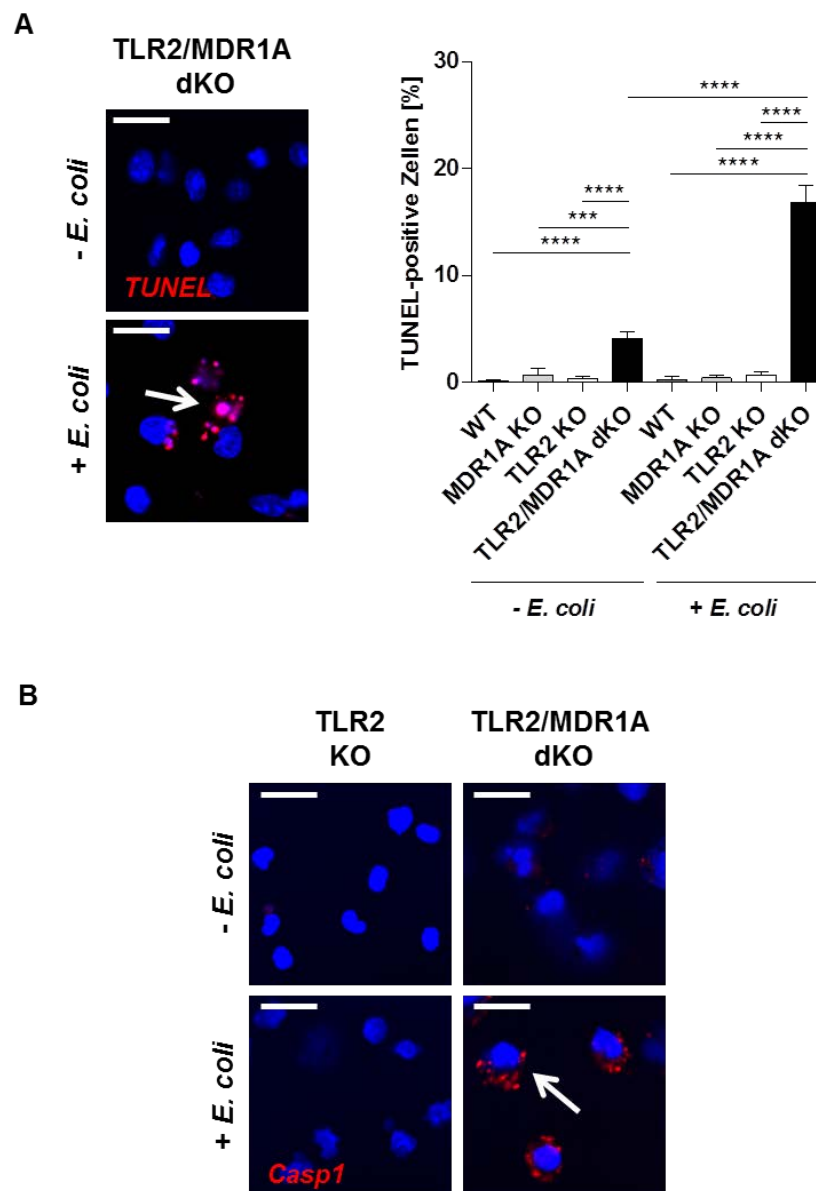


**Abb. 3.33: *E. coli*-induzierter Zelltod in Cd11b<sup>+</sup>-TLR2/MDR1A dKO-myeloischen Zellen.**

Peritonealmakrophagen von WT-, MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen wurden isoliert. Die myeloischen Zellen wurden mit oder ohne *E. coli* (GFP: grün) für 90min behandelt und mittels Immunfluoreszenz zusätzlich auf CD11b (Alexa Fluor® 647: rot) untersucht. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Ausgewertet wurden die Proben am Laser-Scanning-Mikroskop Axiovert 100M LSM 510 (Maßstabsbalken 20µm). Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder von zwei unabhängigen Versuchen. Kontrollfärbungen mit der entsprechenden IgG-Kontrolle wurden für jeden Antikörper separat durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Der weiße Pfeil deutet auf Membranschäden und Nukleusfragmentierung hin, der grüne Pfeil auf eGFP-exprimierende *E. coli*.

Adhärente Cd11b<sup>+</sup>-myeloische Zellen mit Tlr2/Mdr1a-Doppeldefizienz zeigten keinen Unterschied in der Phagozytose des nicht-pathogenen, eGFP-exprimierenden *E. coli* zu WT- und Mdr1a-defizienten Peritonealmakrophagen (Abb. 3.33). Jedoch führte die Behandlung mit *E. coli* in TLR2/MDR1A dKO-Cd11b<sup>+</sup>-Zellen vermehrt zu Plasmamembranruptur und -verlust. Darüber hinaus wurden nukleäre Fragmentierungen nach *E. coli*-Gabe detektiert. Die Tlr2-exprimierenden Mdr1a-defizienten Zellen wie auch WT-Zellen blieben hingegen von eGFP-*E. coli* unbeeinflusst. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Doppeldefizienz von Tlr2 und Mdr1a die kommensale Eliminierung in Makrophagen synergetisch stört.

Aufgrund der in Abb. 3.33 gezeigten Nukleusfragmentierung und der erhöhten Membranpermeabilität wurde anschließend analysiert, ob die Zugabe von nicht-pathogenen *E. coli* zum Zelltod von Tlr2/Mdr1a-doppeldefizienten Cd11b<sup>+</sup>-myeloischen Zellen führt (Abb. 3.34).



**Abb. 3.34: Ausmaß der *E. coli*-induzierten Apoptose via Casp1 in TLR2/MDR1A dKO-myeloischen Zellen.**

Peritonealmakrophagen von WT-, MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen wurden, wie in *Material und Methoden* beschrieben, isoliert. Die myeloischen Zellen wurden mit oder ohne *E. coli* für 90min behandelt. (A) Apoptotische Zellen wurden mittels TUNEL-Assay (TMR: rot) angefärbt und durch Immunfluoreszenz ausgewertet. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Ausgewertet wurden die Proben am Laser-Scanning-Mikroskop *Axiocvert 100M LSM 510* (Maßstabsbalken 20µm). Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz von myeloischen Zellen der TLR2/MDR1A dKO-Mäuse. Kontrollfärbungen mit der entsprechenden IgG-Kontrolle wurden für jeden Antikörper separat durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Der weiße Pfeil zeigt auf TUNEL<sup>+</sup>-Zellen. Die Grafik spiegelt die Zusammenfassung der TUNEL<sup>+</sup>-Zellen von zwei unabhängigen Versuchen wider. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. \*\*\**p* < 0,001; \*\*\*\**p* < 0,0001. (B) Lebende, murine Peritonealmakrophagen wurden auf Casp1-Aktivität (rot) untersucht. Mittels Hoechst 33342 (blau) wurden die Zellkerne sichtbar gemacht. Ausgewertet wurden die Proben am Laser-Scanning-Mikroskop *Axiocvert 100M LSM 510* (Maßstabsbalken 20µm). Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder für jede Kondition. Kontrollfärbungen mit der entsprechenden IgG-Kontrolle wurden für jeden Antikörper separat durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Der weiße Pfeil weist auf Casp1<sup>+</sup>-Zellen hin.



Die Tlr2/Mdr1a-doppeldefizienten Peritonealmakrophagen wiesen bereits basal einen erhöhten Zelltod auf (Abb. 3.34 A). Dies bestätigt, dass bereits allein der Verlust von Tlr2 und Mdr1a in Cd11b<sup>+</sup>-Zellen zu einer Stresssituation führt. Ein zusätzlicher signifikanter Anstieg der DNA-Fragmentierung wurde durch die Behandlung mit den nicht-pathogenen eGFP-*E. coli* verursacht. Im Unterschied dazu wurde in Peritonealmakrophagen von WT-, MDR1A KO- und TLR2 KO-Mäusen, unabhängig von der *E. coli*-Behandlung, kein vermehrter Zelltod festgestellt. Dies legt nahe, dass entweder aktives Tlr2 oder aktives Mdr1a zur Hemmung der mikrobiell-induzierten Apoptose in Makrophagen ausreicht.

Anschließend wurden die Peritonealmakrophagen von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen auf Pyroptose untersucht. Pyroptose ist definiert als pro-inflammatorischer, Casp1-abhängiger Zelltod [95]. Charakteristisch für pyroptotische Zellen ist der Verlust der Plasmamembranintegrität, durch welchen Membranpartikel in das extrazelluläre Milieu freigesetzt werden [95]. Aufgrund der Tatsache, dass die TUNEL-Färbung bei Tlr2/Mdr1a-Doppeldefizienz nach *E. coli*-Behandlung nukleäre Vesikel gezeigt hat, wurde die Casp1-Aktivität in Peritonealmakrophagen analysiert. Hierbei bestätigte der Anstieg der Casp1-Aktivität in Tlr2/Mdr1a-doppeldefizienten Cd11<sup>+</sup>-Zellen die durch *E. coli*-induzierte Pyroptose (Abb. 3.34 B). Unbehandelte Peritonealmakrophagen von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen wiesen, wie auch bereits im TUNEL-Assay, keine Anzeichen von erhöhter Casp1-Induktion auf.

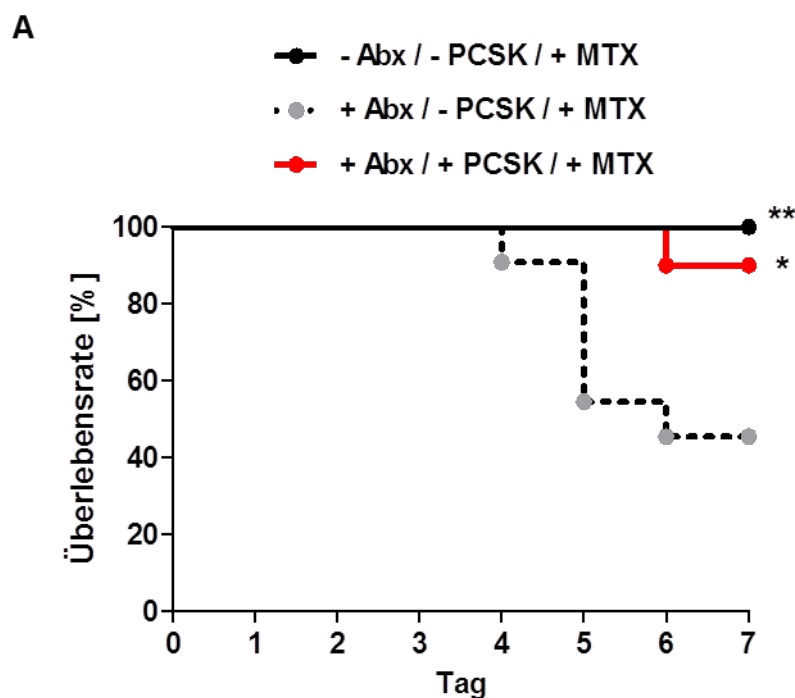
Zusammengefasst legen diese Ergebnisse nahe, dass der protektive Effekt der Tlr2-Aktivierung vor intestinaler Chemotoxizität durch Mdr1a *in-vivo* vermittelt wird. Des Weiteren wurde gezeigt, dass bei Tlr2/Mdr1a-Doppeldefizienz die Behandlung mit nicht-pathogenen *E. coli* zur kommensal-induzierten Pyroptose führt. Hier wird die Bedeutung der Interaktion von Tlr2 und Mdr1a bei der Abwehr von Bakterien deutlich.

### 3.6 Therapieansatz für MTX-induzierte Mukositis in Mäusen

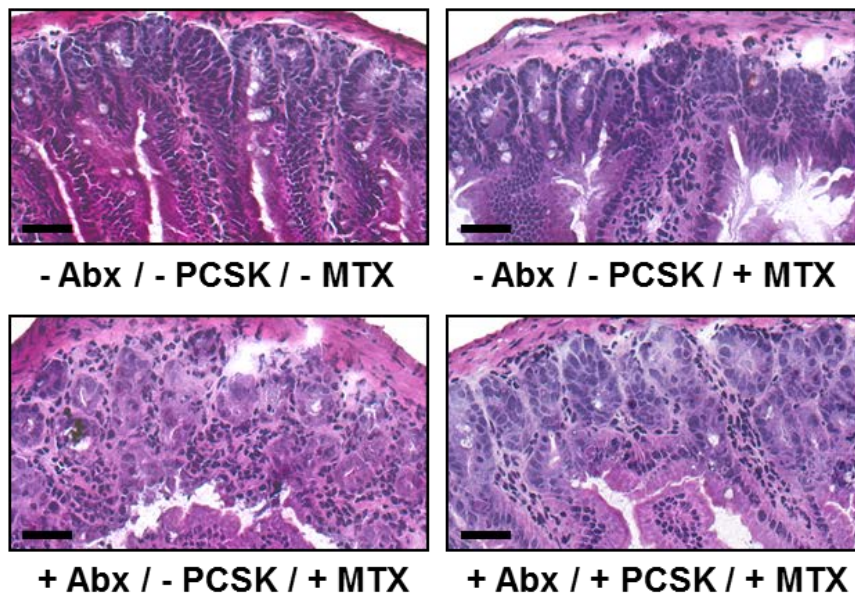
Schließlich wurde die *in-vivo*-Wirkung des synthetischen Tlr2-Liganden PCSK im proximalen Jejunum von WT-Mäusen auf MTX-induzierte Toxizität untersucht. Die endogene Mikrobiota des Gastrointestinaltraktes enthält natürliche Tlr2-Agonisten [158]. Daher wurden zunächst WT-Mäuse mit Breitbandantibiotika (Vancomycin und Zienam<sup>®</sup>; jeweils 50mg/kg Körpergewicht) für fünf Tage (Tag -5 bis Tag -1) dekontaminiert. Von Tag -1 bis maximal Tag 5 des Versuchs wurde den Mikrobiota-depletierten WT-Mäusen sechs Stunden nach der letzten Abx-Behandlung PCSK (150µg/ml) oral im Trinkwasser verabreicht, um speziell Tlr2 zu aktivieren. MTX (40mg/kg Körpergewicht) wurde an Tag 0 und an Tag 1, überlappend mit der PCSK-Behandlung, systemisch *i.p.* injiziert.

#### 3.6.1 Klinische und histopathologische Parameter

Die Überlebensrate der WT-Mäuse wurde bis Tag 7 des Versuches bestimmt (Abb. 3.35 A), die histopathologische Analyse erfolgte an Tag 3 (Abb. 3.35 B).



B



**Abb. 3.35: Ausmaß der Chemotoxizität im proximalen Jejunum nach Depletion der Mikrobiota und Gabe von PCSK *in-vivo*.**

WT-Mäuse wurden mit den Breitbandantibiotika Vancomycin und Zienam® (50mg/kg Körpergewicht) für fünf Tage *p.o.* behandelt (Tag -5 bis Tag -1). Sechs Stunden nach der Abx-Behandlung wurde den Mäusen PCSK (150µg/ml) im Trinkwasser verabreicht (Tag -1 bis maximal Tag 5). An Tag 0 und Tag 1 wurde den Mäusen parallel MTX (40mg/kg Körpergewicht) *i.p.* injiziert. (A) Die Überlebensrate der WT-Mäuse wurde bis Tag 7 untersucht und hier anhand der Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (n=10-12 pro Gruppe). \*p < 0.05; \*\*p < 0.01. (B) Gefrierschnitte des proximalen Jejunums an Tag 3 wurden mit H/E angefärbt und am Aperio ScanScope®-System dokumentiert (n=3-4 pro Gruppe). Dargestellt sind repräsentative Bilder pro Gruppe (Maßstabsbalken 50µm).

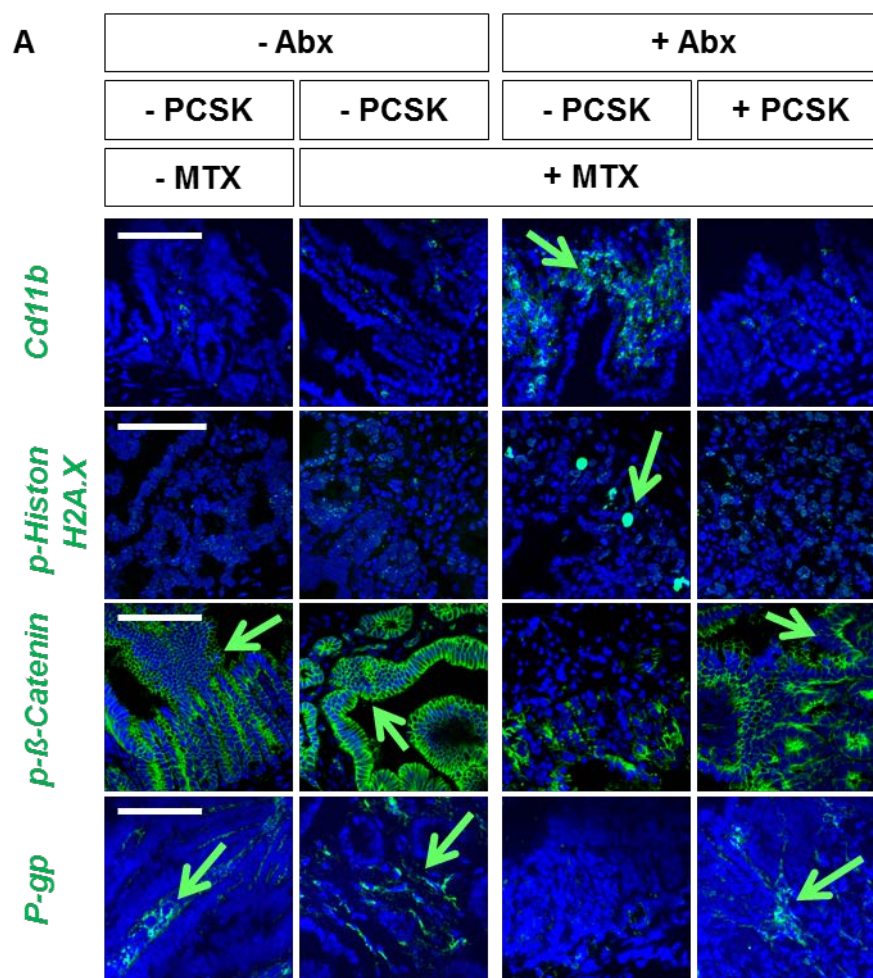
Die Dekontamination des Gastrointestinaltraktes der MTX-behandelten WT-Mäuse mit Abx verursachte einen Anstieg der Morbidität und der Mortalität (55%) (Abb. 3.35 A). Die Supplementierung von PCSK schützte jedoch die Mikrobiota-depletierten WT-Mäuse vor erhöhter Morbidität und Mortalität, welches sich in einer Überlebensrate von 90% widerspiegelte. Die alleinige MTX-Exposition hingegen führte in WT-Mäusen zu keinem Todesfall.

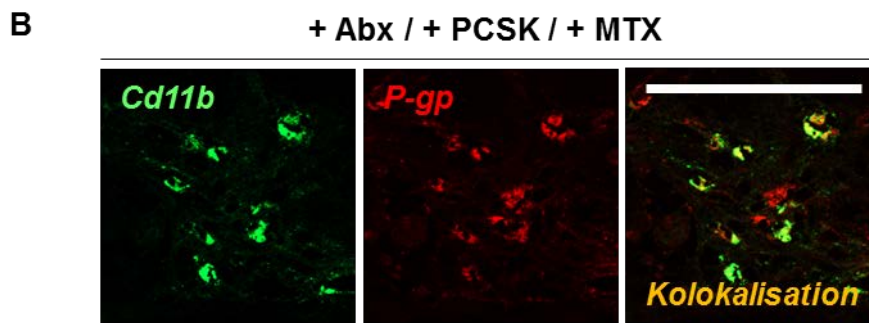
Die histopathologische Untersuchung an Tag 3 bestätigte die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber MTX der Mikrobiota-depletierten WT-Mäuse (Abb. 3.35 B): Das proximale Jejunum dekontaminierter WT-Mäuse wies nach MTX-Behandlung eine fulminante Mukositis auf, welche in der Entzündungsaktivität mit der von TLR2 KO-Mäusen nach Chemotherapie (Abb. 3.3) vergleichbar war. Inflammatorische Infiltrate wurden bis in die Submukosa detektiert. Neben Becherzelldepletion und Villusatrophie wiesen WT-Mäuse Kryptenhypoplasie bis hin zu mukosalen Ulzerationen auf. Wurden die WT-Mäuse parallel zur MTX-Injektion aber zusätzlich mit dem Tlr2-

Liganden supplementiert, zeigte sich eine deutliche Abmilderung der Chemotherapie-induzierten Mukositis und legte einen therapeutischen Effekt von PCSK nahe. Eine vollständige Restitution des proximalen Jejunums wurde jedoch nicht erzielt, da sich weiterhin einige inflammatorische Infiltrate in der Lamina Propria zeigten. Im Vergleich wiesen WT-Mäuse nach alleiniger MTX-Exposition (ohne Antibiose) keine Anzeichen einer Mukositis auf.

### 3.6.2 Inflammatorische Genotoxizität

Anhand Immunfluoreszenzfärbungen wurde der anti-inflammatorische Effekt von PCSK in Mikrobiota-depletierten WT-Mäusen unter Chemotherapie bestätigt (Abb. 3.36).





**Abb. 3.36: Protektiver Effekt der oralen Therapie mit PCSK in Mikrobiota-depletierten WT-Mäusen nach MTX-Gabe.**

WT-Mäuse wurden mit Breitbandantibiotika Vancomycin und Zienam<sup>®</sup> (50mg/kg Körpergewicht) für fünf Tage *p.o.* behandelt (Tag -5 bis Tag -1). Sechs Stunden nach der Abx-Behandlung wurde den Mäusen PCSK (150µg/ml) im Trinkwasser verabreicht (Tag -1 bis maximal Tag 5). An Tag 0 und Tag 1 wurde den Mäusen MTX (40mg/kg Körpergewicht) *i.p.* injiziert. Die Organentnahme erfolgte an Tag 3. (A) Gefrierschnitte des proximalen Jejunums wurden auf Marker (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488: grün) für inflammatorische Infiltrate (Cd11b), DNA-Schäden (p-Histon H2A.X), IEC-Integrität (p-β-Catenin) und Effluxtransporter (P-gp) untersucht. Zellkerne wurden mit DAPI oder TO-PRO<sup>®</sup>-3 Iodide (blau) gegengefärbt. Ausgewertet wurden die Proben mit Hilfe des Lichtmikroskops AxioObserver.Z1 mit ApoTome (Maßstabsbalken 100µm). Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Bildausschnitt (n=2 pro Gruppe). Kontrollfärbungen mit der entsprechenden IgG-Kontrolle wurden für jeden Antikörper separat durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die grünen Pfeile weisen exemplarisch auf positiv-gefärbte Zellen hin. (B) Repräsentative Kokokalisation von Cd11b (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488: grün) und P-gp (Alexa Fluor<sup>®</sup> 350: rot) in Zellen der Lamina Propria des proximalen Jejunums von behandelten WT-Mäusen (n=2 pro Gruppe). Ausgewertet wurden die Proben mit Hilfe des Lichtmikroskops AxioObserver.Z1 mit ApoTome (Maßstabsbalken 100µm). Die Kokokalisationsareale stellen sich im fusionierten Bild gelb dar. Eine Kontrollfärbung mit der entsprechenden IgG-Kontrolle wurde für jeden Antikörper separat durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Die in Abb. 3.35 B gezeigten inflammatorische Infiltrate in der Lamina Propria von Mikrobiota-depletierten WT-Mäusen nach Chemotherapie waren hauptsächlich Cd11b<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 3.36 A). Bei doppelsträngigen DNA-Brüchen wird Histon H2A.X phosphoryliert [156]. Die Dekontamination des proximalen Jejunums von MTX-behandelten WT-Mäusen führte zu einer vermehrten Phosphorylierung von Histon H2A.X und deutete auf einen erhöhten toxischen Effekt von MTX bei Verlust der Mikrobiota hin. Darüber hinaus wurde anhand der Depolarisation von Phospho-β-Catenin gezeigt, dass die Depletion der Mikrobiota vor Chemotherapie mit Störungen der Zell-Zell-Adhäsion wie auch der Barriereintegrität in IEC assoziiert ist.

Durch orale Supplementierung mit dem Tlr2-Liganden wurde die Akkumulation der Cd11b<sup>+</sup>-inflammatorischen Infiltrate signifikant gehemmt. Dies stimmt mit den Daten der histopathologischen Untersuchung überein (Abb. 3.35 B). Zusätzlich wurde die MTX-induzierte Zytotoxizität im proximalen Jejunum von Mikrobiota-depletierten WT-Mäusen durch PCSK-Behandlung abgemildert: DNA- wie auch Membranschäden konnten nicht mehr detektiert werden. Das proximale Jejunum von WT-Mäusen, die

---

nur mit dem Chemotherapeutikum behandelt wurden, wies, vergleichbar mit Abb. 3.3, keine Anzeichen einer Mukositis auf.

Bisher wurde gezeigt, dass die Herunterregulation von P-gp mit Mukositis unter MTX korreliert werden kann (Kapitel 3.2.6). Dies wurde auch in Abb. 3.36 A bestätigt: In der entzündeten Lamina Propria von Mikrobiota-depletierten WT-Mäusen wurde ein kompletter Verlust von P-gp durch MTX-Gabe verursacht. Die Verabreichung des Tlr2-Liganden PCSK, der die MTX-induzierte Mukositis im proximalen Jejunum von Abx-behandelten WT-Mäusen verhinderte, unterband die Suppression von P-gp in Cd11b<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 3.36 A + B).

Insgesamt verdeutlichten diese Ergebnisse, dass die Depletion der Mikrobiota in MTX-behandelten WT-Mäusen zur fulminanten Mukositis führt. Die orale Supplementierung von PCSK schützte jedoch *in-vivo* vor mukosaler Toxizität.



## 4 Diskussion

Die intestinale Mukositis ist die häufigste Nebenwirkung unter Chemotherapie und ist bisher nur unzureichend behandelbar. Sie beeinträchtigt erheblich die Lebensqualität von Krebs-Patienten. Die Pathogenese der Chemotherapie-induzierten Mukositis ist bislang nicht vollständig geklärt (Kapitel 1.1) [180, 204]. In der vorliegenden Dissertation konnte erstmals ein kausaler Zusammenhang zwischen der angeborenen Immunantwort via TLR und der durch Chemotherapeutika induzierten Genotoxizität in der Dünndarm-Mukosa gezeigt werden. Das in dieser Studie verwendete Chemotherapeutikum MTX ist im klinischen Alltag eines der am häufigsten eingesetzten Chemotherapeutika bei verschiedenen Krebserkrankungen, unter anderem bei Brustkarzinom, akuter lymphatischer Leukämie, Osteosarkom und Chorionkarzinom in pädiatrischen und erwachsenen Patienten [10].

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit gezeigt [52], dass der genetische Verlust von Tlr2 in Mäusen eine fulminante MTX-induzierte Mukositis bei Modulation des xenobiotischen Metabolismus, insbesondere mit Herunterregulation des Abc-Transporters P-gp, im murinen Dünndarm verursachte. Hierbei triggerte funktionell der Md-2/Tlr4-Signalweg die Progression der Mukositis. Es wurde *in-vitro* und *in-vivo* gezeigt, dass TLR2 die Expression und die funktionelle Aktivität des ABCB1/MDR1-kodierten P-GP induziert. TLR2-Stimulation führte zum Efflux von MTX via P-GP aus myeloischen Zellen, nicht jedoch aus IEC, welches die zelluläre Akkumulation und Toxizität des Chemotherapeutikums hemmte. Ein signifikanter Unterschied in der bakteriellen Diversität der WT- und TLR2 KO-Mäuse konnte nach MTX-Gabe nicht eindeutig festgestellt werden. Die Eliminierung der Mikrobiota mittels oraler Breitbandantibiotika-Behandlung von WT-Mäusen beschleunigte die Progression der Mukositis im Dünndarm, welche mit einem P-gp-Verlust in der intestinalen Mukosa einherging. Die orale Supplementierung eines spezifischen Tlr2-Liganden während der Chemotherapie in Abx-behandelten WT-Mäusen führte hingegen zu einer signifikanten Reduktion der Morbidität bei verringertem genotoxischem Schaden, welcher mit dem Erhalt der P-gp-Expression in mononukleären Zellen der Lamina Propria in der Dünndarm-Mukosa korrelierte. *Ex-vivo*-Versuche bestätigten mechanistisch, dass die Aktivierung des Tlr2-Signalweges nicht vor MTX-induzierter Apoptose bei Mdr1a-Defizienz schützt. Diese Daten bringen erstmals die

angeborene Immunantwort der intestinalen Mukosa mit dem xenobiotischen Transport via P-GP in Verbindung und bieten möglicherweise einen neuen Ansatzpunkt für Therapieoptionen gegen Chemotherapie-induzierte Nebenwirkungen im Gastrointestinaltrakt.

Die Hauptfunktion des ABC-Transporters P-GP ist der Efflux von verschiedenen Xenobiotika, unter anderem von Chemotherapeutika (siehe Einleitung; [165]). In dieser Dissertation wurde gezeigt, dass der extrazelluläre Transport des Mukositis-induzierenden MTX, zumindest teilweise, durch P-GP gesteuert wird. Der erhöhte Efflux des Chemotherapeutikums nach TLR2-Aktivierung mit PCSK via P-GP führte zu einer abgemilderten Zytotoxizität in THP-1-Zellen. Dies legte nahe, dass die TLR2-vermittelte P-GP-Aktivität beim Schutz vor Chemotherapie-induzierter Mukositis mitentscheidend ist. De Graaf *et al.* deuteten bereits an, dass MTX ein P-GP-Substrat ist [34]. Der MTX-Efflux wurde in dieser Arbeit signifikant, aber nicht vollends durch den P-GP-Inhibitor C-4 gemindert. Kim *et al.* wiesen auf eine spezifische Bindung des Inhibitors C-4 an P-GP hin [92]. Zukünftig muss untersucht werden, ob durch den P-GP-Inhibitor C-4 nicht noch andere Signalwege beeinflusst werden, die die MTX-induzierte Toxizität sekundär moduliert haben könnten. Des Weiteren muss bestätigt werden, ob andere P-GP-Inhibitoren, wie z.B. Verapamil oder Cyclosporin A [205], den MTX-Efflux ebenfalls hemmen. Zusätzlich muss die MTX-Substratspezifität und -bindung für das ABCB1/MDR1-kodierte P-GP bestimmt werden.

Wird davon ausgegangen, dass der P-GP-Inhibitor C-4 allein spezifisch für P-GP ist, könnte der nur teilweise unterbundene MTX-Efflux in THP-1-Zellen für mindestens einen weiteren Transporter sprechen, der beim MTX-Efflux aktiv mitwirkt. Die Genexpressionsanalyse vom proximalen Jejunum von MTX-behandelten TLR2 KO-Mäusen zeigte eine spezifische Modulation der Gene, welche mit dem xenobiotischen Metabolismus assoziiert werden, einschließlich weiterer Abc-Transporter, die sich teilweise in ihrer Substratspezifität überschneiden [68, 104]. Neben Abcb1/Mdr1-kodiertem P-gp [34, 166] wurde die Genexpression von Abcc1, Abcc2, Abcc4 sowie Abcg2 im entzündeten proximalen Jejunum von TLR2 KO-Mäusen nach MTX-Gabe deutlich dereguliert. Es ist bereits bekannt, dass die aktiven



ABC-Transporter ABCC1, ABCC2, ABCC4 und ABCG2 am MTX-Efflux beteiligt sind [70, 161]. Hooijberg *et al.* bewiesen, dass die Überexpression von ABCC1 und ABCC2 in der humanen Ovarialkarzinom-Zelllinie 2008 kurzfristig zu einer erniedrigten intrazellulären MTX-Akkumulation und somit zu einer höheren Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum führt [70]. Der von Sane *et al.* beschriebene höhere MTX-Spiegel im Gehirn von ABCG2/ABCC4 dKO-Mäusen wies, im Vergleich zu WT-Kontrollmäusen, auf die MTX-Transportfähigkeit dieser beiden ABC-Transporter hin [161]. Die Defizienz von nur einem der beiden Transporter führte lediglich zu einer geringgradig höheren, aber nicht-signifikanten MTX-Akkumulation. Demnach blieb der MTX-Efflux beim genetischen Verlust von ABCG2 oder ABCC4, wahrscheinlich durch Kompensation des jeweils anderen Transporters, größtenteils erhalten. Die hier beschriebene P-gp-Herunterregulation in MTX-behandelten TLR2 KO-Mäusen könnte sekundär zu einer Abcc1- und Abcc4-Aktivierung in der entzündeten Mukosa geführt haben, um der ansteigenden intrazellulären MTX-Akkumulation gegenzusteuern bzw. die daraus resultierende Toxizität abzumildern. Die Abcc2- und Abcg2-mRNA-Genexpression wurde hingegen in der entzündeten Mukosa von TLR2 KO-Mäusen nach MTX-Gabe herunterreguliert. Zukünftige Studien müssen klären, inwieweit diese Abc-Transporter am Phänotyp von TLR2 KO-Mäusen mit MTX-induzierter intestinaler Mukositis kausal mitbeteiligt sind. Maus- bzw. Zellmodelle mit Defizienzen einzelner oder mehrerer Abc-Transporter in Kombination und zelluläre Analysen der potentiell synergistischen Wirkung dieser Transporter könnten hierbei hilfreich sein.

Neben den Abc-Transportern wurden auch Phase I- und Phase II-Enzyme im proximalen Jejunum von Tlr2-defizienten Mäusen nach MTX-Gabe moduliert. Bei der Phase I-Enzymreaktion, in der Cyp450-Gene entscheidend sind, entstehen reaktive Produkte, die erst durch Phase II-Enzyme unschädlich gemacht werden [63]. In dieser Arbeit war die mRNA-Genexpression des Cyp450-Gens Cyp1a1 im gesunden Gewebe des proximalen Jejunums bereits basal bei alleiniger Tlr2-Defizienz herunterreguliert. MTX-Gabe führte schließlich zu einem fast vollständigen Verlust der Cyp1a1-mRNA-Genexpression in der entzündeten Darmschleimhaut. Diese Daten wiesen auf eine Tlr2-abhängige Regulation von Cyp1a1 im Dünndarm hin, wie

bereits durch Do *et al.* gezeigt [40]. Darüber hinaus wurde nach MTX-Gabe eine inverse Regulation von Cyp1b1 und Cyp2c29 im Tlr2-defizienten proximalen Jejunum detektiert. Cyp450-Gene sind im Metabolismus von verschiedenen Chemotherapeutika involviert [207]. Weiterhin ist bekannt, dass sich die Substrate der Subgruppe CYP3A mit denen von P-GP überlappen [225]. Daher könnte der MTX-vermittelte P-gp-Verlust in TLR2 KO-Mäusen durch Modulation von Cyp450-Genen zumindest teilweise gegenkompensiert werden. Zukünftig muss ergänzend geklärt werden, ob und wie der TLR2-Signalweg diese CYP450-Gene funktionell direkt oder indirekt steuern könnte.

Der Transkriptionsfaktor Nr1i2 reguliert eine Vielzahl von Cyp450-Genen und Abc-Transportern, unter anderem auch Abcb1/Mdr1 [57]. Es wurde vor Kurzem beschrieben, dass NR1I2 KO-Mäuse eine Hochregulation des Tlr4-Signalweges und eine gestörte IEC-Barriereintegrität aufweisen [206]. NR1I2/TLR4 dKO-Mäuse zeigten im Gegensatz dazu keine auffälligen Symptome. Die in dieser Arbeit gezeigte MTX-induzierte Herunterregulation des Transkriptionsregulators Nr1i2 könnte zu einem konsekutiven P-gp-Verlust und anschließend zur Mukositis geführt haben. Der aktive Md-2/Tlr4-Signalweg triggerte die MTX-induzierte Mukositis bei Tlr2-Defizienz. Es gibt Anzeichen dafür, dass TLR4 durch Modulation der Blut-Hirn-Schranke inflammatorische Reaktionen begünstigt [214]. Tlr4 könnte möglicherweise sekundär durch die MTX-vermittelte Herunterregulation von Nr1i2 im Rahmen von bakterieller Translokation durch Verlust der Barriereintegrität aktiviert worden sein und so den Verlauf der Mukositis gesteuert haben. Vergangene Studien deuteten an, dass TLR4 die P-GP-Aktivität beeinflusst [60]. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, inwieweit NR1I2 und TLR4 miteinander interagieren und ob diese mögliche wechselseitige Beziehung den Signalweg vom ABCB1/MDR1-kodierten P-GP moduliert.

Im entzündeten proximalen Jejunum von TLR2 KO-Mäusen wurde ebenfalls eine Herunterregulation der Nlrp6-mRNA-Genexpression nach MTX-Exposition beobachtet. Es ist bereits bewiesen worden, dass Nlrp6 die Wundheilung im murinen Colon nach DSS-Gabe unterstützt [130]. Der progressive Verlauf der MTX-induzierten Mukositis bei Tlr2-Defizienz könnte daher durch den Verlust der Nlrp6-abhängigen Restitution des Dünndarms begünstigt worden sein. MTX-Gabe

deregulierte bei Tlr2-Defizienz weiterhin verschiedene Matrix-Metalloproteinasen (Mmp). Mmp, die im gesunden Gewebe nicht exprimiert werden [143], bauen im aktiven Zustand die extrazelluläre Matrix ab [139]. Die Hochregulation von Mmp3, Mmp8, Mmp10 und Mmp19 im Tlr2-defizienten proximalen Jejunum nach MTX-Gabe könnte die Kommunikation zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix gestört und zu zusätzlichen Mukosaschäden geführt haben. Darüber hinaus wurde die Il33-mRNA-Genexpression in TLR2 KO-Mäusen nach MTX-Behandlung hochreguliert. Es wurde bereits beschrieben, dass in Il33-defizienten Mäusen die Irinotecan-vermittelte Mukositis signifikant abgeschwächt wird [62]. Demnach könnte die Hochregulation der Il33-mRNA-Genexpression bei der Induktion der Chemotherapie-verursachten Mukositis mitgewirkt haben. Wie die MTX-vermittelte Modulation von Nlrp6, Il33 und den Mmp bei Tlr2-Defizienz primär oder sekundär molekular induziert wurde, müssen weitere Studien untersuchen.

Die hier gezeigten Daten deuteten darauf hin, dass die Induktion von P-gp in murinen Cd11b<sup>+</sup>-myeloischen Zellen die Chemotherapie-induzierte Toxizität im Dünndarm zu verringern vermag. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Zellspezifische protektive Tlr2-Mechanismen daran beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit wurde im proximalen Jejunum von TLR2 KO-Mäusen nach MTX-Gabe eine Störung der intestinalen epithelialen Barriereintegrität detektiert: In den IEC wurde Phospho- $\beta$ -Catenin [228] bei Tlr2-Defizienz nach Chemotherapie deutlich depolarisiert. TLR2 reguliert das komplexe Netzwerk von *Tight*- und *Gap-Junctions* im intestinalen Epithel [17, 43]. Unsere Arbeitsgruppe zeigte bereits, dass TLR2-Stimulation die transepitheliale Barriere der IEC durch die apikale Umverteilung des *Tight-Junction*-Proteins TJP1 zu verstärken vermag [17]. Durch die Bindung von TJP1 an CX43 wurde die interzelluläre Kommunikation stabilisiert und die mukosale Homöostase erhalten [43]. Tjp1 ist an der Vernetzung des E-Cadherin/Catenin-Komplexes mit dem aus Aktin-basierenden Zytoskelett beteiligt [75]. Infolgedessen könnte die Desorganisation von TJP1 parallel eine Störung der E-Cadherin-abhängigen Zell-Zell-Adhäsion bewirken. IEC-spezifische Cx43-Defizienz verursachte eine Störung der Tlr2-vermittelten IEC-Restitution im Rahmen der Wundheilung [43]. Bei Tlr2-Defizienz führte akuter inflammatorischer Stress zu einem

vollständigen Verlust von *Tight-* und *Gap-Junctions* [19, 43]. Behandlung mit einem TLR2-Liganden schützte hingegen die IEC-Barriereintegrität und führte zu einer Abmilderung der DSS-induzierten Colitis in WT-Mäusen [19, 151].

MTX-Exposition führte zu einem Verlust von Tff3-exprimierenden Becherzellen in TLR2 KO-Mäusen, nicht aber in WT-Mäusen. Tff3 ist für die IEC-Wundheilung und Reparatur der intestinalen Mukosa mitverantwortlich [151]. In einer früheren Studie erkrankten TFF3 KO-Mäuse nach DSS-Gabe an einer fulminanten Colitis und zeigten eine hohe Mortalität bei mangelnder mukosaler Restitution [151]. Die Tff3-induzierte Wundheilung war zumindest teilweise Tlr2-abhängig [151]: Im Dünndarm von TLR2 KO-Mäusen wurde basal im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant weniger Tff3 exprimiert. Tlr2-Stimulation mit PCSK förderte in DSS-behandelten WT-Mäusen die Becherzellregeneration und verringerte via Tff3 die Apoptoserate. Die *in-vivo* MTX-induzierte Mukositis bei Tlr2-Defizienz könnte daher durch eine Beeinträchtigung der Wundheilung via Tff3 mitverursacht worden sein.

Des Weiteren untersuchte die vorliegende Arbeit, über welchen Signalweg TLR2 den ABC-Transporter P-GP bei MTX-Gabe reguliert. Es wurde gezeigt, dass in THP-1-Zellen die Phosphorylierung von MKK3/MKK6-MAPK und von P38-MAPK nach TLR2-Stimulation gleichzeitig mit der Proteinexpression des ABCB1/MDR1-kodierten P-GP induziert wurde, unabhängig von einer konsekutiven MTX-Gabe. Matsuzawa *et al.* bestätigten die TLR2-abhängige Aktivierung von P38-MAPK [118]. Möglicherweise könnte die TLR2-induzierte Phosphorylierung von MKK3/MKK6-MAPK und P38-MAPK die MTX-verursachte Zytotoxizität via P-GP gehemmt haben. Eine protektive Wirkung von P38-MAPK vor DNA-Schäden durch Doxorubicin, Methylmethansulfonat oder UV-Strahlen wurde bereits zuvor beschrieben [147]. Aktives P38-Mapk wurde zudem mit P-gp-induzierter Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Vincristin assoziiert [6]: In der murinen leukämischen, P-gp-überexprimierenden Zelllinie L1210/VCR sank die letale Dosis von Vincristin nach P38-Mapk-Inhibierung. Es ist aber nicht auszuschließen, dass der hierfür verwendete P38-Mapk-Inhibitor SB203580 möglicherweise andere Signalwege mitmoduliert hat, die die P-gp-abhängige Vincristin-Resistenz letztendlich sekundär unterbunden haben. In Zukunft muss auch geklärt werden, ob TLR2-induzierte

Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 [216] oder CREB [124], gegebenenfalls an die Promotorregion des ABCB1/MDR1-Gens binden und so die Expression des ABC-Transporters modulieren.

Die PCSK-induzierte Phosphorylierung von P38-MAPK in THP-1-Zellen sank nach kurzer Zeit wieder auf basale Werte ab, während parallel die totale MKP1-Expression proportional anstieg. Es ist bereits bekannt, dass aktives MKP1 ein Negativregulator der P38-MAPK ist [25]. MTX-Gabe führte zwar in THP-1-Zellen zu einer verringerten MKP1-Proteinexpression, P38-MAPK wurde aber durch das Chemotherapeutikum nicht moduliert. Möglicherweise deregulierte MTX die Interaktion zwischen MKP1 und P38-MAPK. PCSK-Stimulation unterband die MTX-induzierte Herunterregulation von MKP1, welches auf eine TLR2-abhängige MKP1-Aktivierung in CD11b<sup>+</sup>-myeloischen Zellen hindeutet. Es wurde bereits in Cd11b<sup>+</sup>-Makrophagen gezeigt, dass die PCSK-Gabe zu einer erhöhten Mkp1-Expression führte [27], während aber in Enterozyten keine Tlr2-vermittelte Modulation von Mkp1 detektiert wurde [212]. TLR2 könnte infolgedessen Zelltyp-spezifisch die Interaktion von P38-MAPK und MKP1 in CD11b<sup>+</sup>-myeloischen Zellen modulieren und so möglicherweise via P-GP vor Chemotoxizität schützen. Bisher wurde aber MKP1 mit dem Signalweg des ABC-Transporters P-GP nicht in Verbindung gebracht.

Weiterhin müssen zukünftige Studien zeigen, ob die toxische Akkumulation anderer Medikamente (z.B. antineoplastischer oder immunsuppressiver Agentien) ebenfalls durch Aktivierung des TLR2-Signalweges via P-GP reduziert wird. Hierzu könnten andere Chemotherapeutika, wie z.B. Vinblastin, welche als P-GP-Substrate dienen [72] und bisher nicht mit dem TLR2-Signalweg assoziiert wurden, untersucht werden.

Das P-gp-Substrat Doxorubicin [104] blockiert als Interkalans die DNA-Synthese und hemmt Topoisomerase II [11]. Als Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Anthrazyklinantibiotika inhibiert es die pro-inflammatorische Zytokinantwort auf *E. coli* in THP-1-Zellen [49]. Kaczmarek *et al.* zeigten, dass die Doxorubicin-Behandlung in WT-Mäusen zu einer fulminanten Mukositis führt [81]. Die in dieser Arbeit untersuchten WT-Mäuse wiesen aber nach alleiniger MTX-Gabe kaum Anzeichen

einer Mukositis auf, wie bereits schon von Beck *et al.* gezeigt [7]. Erst nach zusätzlicher Abx-Behandlung (Vancomycin und Zienam<sup>®</sup>) traten in WT-Mäusen MTX-induzierte mukosale Entzündungen auf. Möglicherweise könnte die Eliminierung der protektiven, kommensalen Bakterien [71] durch Abx für die Entstehung der Mukositis verantwortlich sein. Eine andere Hypothese wäre, dass eine Fehlbesiedlung der Mikrobiota durch Abx-resistente Bakterien verursacht wurde [15]. In der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass TLR2 KO-Mäuse, die zusätzlich eine Md-2-Defizienz aufweisen, keine MTX-induzierte Mukositis entwickeln. Kaczmarek *et al.* beschrieben in Doxorubicin-behandelten TLR2 KO-Mäusen eine hochgradig abgemilderte Mukositis im Vergleich zu WT-Mäusen [81]. Dies könnte durch die Doxorubicin-vermittelte Beseitigung von gram-negativen Darmbakterien, wie *E. coli*, verursacht worden sein, wodurch der Md-2/Tlr4-Signalweg gegebenenfalls nicht mehr induziert wurde.

Die Daten von Kaczmarek *et al.* [81] und die hier gezeigten Ergebnisse können allerdings nicht ohne Einschränkungen miteinander verglichen werden, da der Versuchsaufbau jeweils unterschiedlich war. Es ist außerdem nicht auszuschließen, dass die Haltungsbedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeitsgehalt, Hell/Dunkel-Zyklus) der Mäuse sowie die SPF-Voraussetzungen nicht identisch waren. Dessen ungeachtet wurde in der Publikation von Kaczmarek *et al.* nicht erwähnt, ob die TLR2 KO- und die WT-Kontrollmäuse *littermates* waren [81]. Der Unterschied der Histopathologie von WT- und TLR2 KO-Mäusen 72h nach Doxorubicin-Gabe war nicht signifikant und es fehlten darüber hinaus quantitative Belege [81].

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass der ABC-Transporter P-GP konstitutiv bzw. induzierbar unter anderem auf hämatopoetischen Zellen, auf mukosalen Lymphozyten und auf der apikalen Seite der IEC exprimiert wird [141]. Aufgrund der Tatsache, dass in den hier verwendeten TLR2 KO-Mäusen Tlr2 in allen Zellen deletiert wurde, kann es vermutlich zu einer Modulation von P-gp im ganzen Organismus bei systemischer Chemotherapie-Reaktion gekommen sein. Es konnte *in-vivo* nicht festgestellt werden, welche Zelltypen im Einzelnen für die Exazerbation der MTX-induzierten Mukositis mechanistisch verantwortlich waren. Zukünftig könnten Zelltyp-spezifische KO-Mäuse (z.B. Cre/loxP-System) generiert werden, um

die Rolle des potenziellen Signalweges TLR2 → P-GP in der Lamina Propria unter Chemotoxizität zu charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass P-gp in der Lamina Propria vor allem in Cd11b<sup>+</sup>-Zellen exprimiert wurde. Daher wären Mäuse interessant, die beispielsweise die Tlr2-Defizienz nur in Cd11b<sup>+</sup>-myeloischen Zellen aufweisen würden.

Der hier beschriebene Verlust von P-gp in der entzündeten Mukosa von TLR2 KO-Mäusen war mit einer erhöhten Tlr4-mRNA-Genexpression assoziiert. MD-2 KO-Mäuse waren gegen MTX-induzierten mukosalen Schaden resistent. Die zusätzliche Md-2-Defizienz in TLR2 KO-Mäusen hemmte die Chemotherapie-vermittelte Mukositis. Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe belegten, dass die gleichzeitige Defizienz von Tlr2 und Mdr1a zu einer chronischen Colitis führt [44]. Bei Tlr2/Mdr1a-Doppeldefizienz zeigte sich eine erhöhte Md-2-Aktivität bei LPS-Hypersensitivität, wobei der Colitisverlauf durch kommensal-getriggerten, ROS-vermittelten lysomalen Schaden und Pyroptose via Il1 $\beta$  beschleunigt wurde. De Koning *et al.* beschrieben in BALB/c-Mäusen eine Verschlimmerung der MTX-induzierten Mukositis durch LPS-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Mäusen [36]. LPS-resistente C3H/HeJ-Mäuse erholten sich schneller von einer durch MTX-Injektion verursachten Körpergewichtsabnahme als die LPS-sensitiven C3H/HeN-Kontrollmäuse. Demnach könnte der MD-2/TLR4-Signalweg für den Schweregrad der Chemotherapie-induzierten mukosalen Entzündung entscheidend sein. Die beiden Teilversuche von de Koning *et al.* unterschieden sich aber in der Dauer der MTX-Gabe sowie in der Konzentration des Chemotherapeutikums [36]. C3H-HeJ- bzw. C3H-HeN-Mäuse wurden nach MTX-Gabe nur auf klinische Unterschiede, nicht aber histopathologisch untersucht.

Die MTX-Behandlung und/oder eine TLR2-Defizienz könnten via P-GP zu einer Dysbiose führen, die mit der bereits beschriebenen LPS-Hypersensitivität einhergeht. Die in dieser Arbeit untersuchten WT- und TLR2 KO-Mäuse zeigten jedoch, unabhängig von der MTX-Gabe, keine statistisch signifikanten Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung des proximalen Jejunums. Die einzelnen Mäuse unterschieden sich, trotz gleichem Verwandtschaftsgrad, hochgradig in der bakteriellen Diversität. Diese Variabilität wurde ebenfalls durch zwei weitere Studien

von Gu *et al.* und Stockinger *et al.* im murinen Jejunum bestätigt [61, 187]. Ubeda *et al.* nahmen an, dass der Einfluss der Tlr2-Defizienz auf die bakterielle Zusammensetzung im Dünndarm eher gering sein müsse [199]. In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe wiesen TLR2/MDR1A dKO-Mäuse, die ab einem Alter von fünf Wochen an einer Spontancolitis erkrankten, ebenfalls keinen Unterschied in der mikrobiellen Diversität im Vergleich zu MDR1A KO-Mäusen mit einer geringgradigen Colitis auf [44].

Es wurde beschrieben, dass der P-gp-Verlust mit einer Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung im Caecum assoziiert ist [129]. Diese Deregulation der Mikrobiota könnte die Entwicklung der spontanen Entzündung im ganzen Darm, vor allem aber im Colon, von MDR1A KO-Mäusen beeinflusst haben [129]. Jedoch könnte auch die inflammatorischen Reaktion ihrerseits zur Dysbiose führen [23]. Darüber hinaus wurde die Chemotherapie-induzierte Diarrhö mit der Modulation der bakteriellen Zusammensetzung assoziiert [188, 203]. Siccardi *et al.* beschrieben, dass *in-vitro* die Zugabe von *S. typhimurium* zu IEC einer erhöhten intrazellulären Akkumulation des P-GP-Substrates Rhodamine 123 führt [174]. Demnach könnte *S. typhimurium* möglicherweise den P-GP-Verlust initiieren und konsekutiv die protektive Wirkung des ABC-Transporters aufheben und die pathogene Invasion erleichtern. Während die in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Daten auf keine einheitliche Veränderung der Darm-Mikrobiota bei Verlust des Abcb1/Mdr1-kodierten P-gp in MTX-behandelten TLR2 KO-Mäusen hingedeutet haben, legten die beiden Studien von Siccardi *et al.* und Nones *et al.* nahe, dass die Störung der Darm-Mikrobiota entweder der Auslöser oder die Konsequenz des Verlustes von P-GP sein könnte [129, 174]. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob und inwieweit MTX-vermittelte Toxizität via P-GP mit einer gestörten Mikrobiota assoziiert werden kann. Eine Wiederholung des hier beschriebenen Versuches mit z.B. mehr Mäusen pro Gruppe könnte möglicherweise einen statistisch eindeutigen Unterschied in der bakteriellen Zusammensetzung bei Tlr2-Defizienz im Vergleich zu WT-Mäusen zeigen.



Während der Krebs-Behandlung werden Patienten oft prophylaktisch verschiedene Abx verabreicht. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Depletion der Mikrobiota durch oral-zugeführte Breitbandantibiotika (Vancomycin und Zienam<sup>®</sup>) unter Chemotherapie in WT-Mäusen zu erhöhter Morbidität und Mortalität mit einer fulminanten Mukositis im proximalen Jejunum führt. Es wurde zuvor beschrieben, dass die Depletion der Darm-Mikrobiota durch Abx die therapeutische Wirkung von Chemotherapeutika herabsetzt [73, 208]. Iida *et al.* zeigten in Abx-behandelten oder keimfreien Mäusen mit MC38- bzw. EL4-Tumor, dass die Darm-Dekontamination zu abgeschwächten CpG-Oligodeoxynukleotid (ODN)- bzw. Oxaliplatin-Wirkungen führt [73]. Mit P815-Mastozytom- bzw. mit MCA205-Sarkom-injizierte WT-Mäuse wiesen nach Eliminierung der Darm-Mikrobiota eine Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Cyclophosphamid auf [208]. Demnach scheint eine intakte Mikrobiota für eine optimale Wirkung der Chemotherapie notwendig zu sein. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Abx-Behandlung bei Krebs-Patienten zu einem verringerten Erfolg der Chemotherapie trotz erhöhter Toxizität führen könnte. Die prophylaktische Verabreichung von Abx bei der Krebs-Behandlung sollte daher hinterfragt werden.

Die hier beschriebenen Daten zeigten, dass Tlr2-Aktivierung durch PCSK die toxischen Effekte abmildern könnte, die durch Chemotherapeutika in Verbindung mit Abx-Behandlung entstehen. Eine kostengünstigere Alternative als PCSK, die Stress-induzierte Chemotoxizität zu reduzieren, wäre möglicherweise die Gabe von Probiotika [28, 80]. Bisher wurde ein protektiver Effekt von *Lactobacillus (L.) acidophilus* bei 5-Fluorouracil (5-FU)-induzierter Mukositis im murinen Dünndarm beschrieben [80]. Weiterhin milderte die Tlr2-Aktivierung durch *L. rhamnosus* (LGG) Bestrahlung-induzierte Dünndarmschäden in WT-Mäusen, im Gegensatz zu TLR2 KO-Mäusen, ab [28]. Dieser schützende, Tlr2-vermittelte Wirkmechanismus war mindestens teilweise Cox-2-abhängig. Hierbei modulierte die LGG-Gabe nicht die Expression, sondern führte zu einer zellulären Positionsänderung von Cox-2 [28]. Nach LGG-Gabe wurde Cox-2 in den Krypten detektiert. Dies führte zu einer erhöhten Überlebensrate der Krypten und zu einer verminderten Apoptose der Epithelzellen nach Bestrahlung. Durch diesen protektiven Einfluss könnte die Überlebensrate der Probiotika-behandelten WT-Mäuse nach Bestrahlung erhöht werden [28]. Pilotstudien deuteten darauf hin, dass die Zugabe von LGG beim

colorektalen Karzinom sowie beim Uterus-, Ovarial- und Prostatakarzinom nach Chemotherapie mit 5-FU bzw. nach Bestrahlung zu einer abgemilderten Diarrhö führt [136, 201]. Nach postoperativer Bestrahlung schwächte die prophylaktische Behandlung mit dem VSL#3-Präparat, welches aus verschiedenen Bakterienstämmen besteht, die Mukositis mit Diarrhö ebenfalls ab [38]. Bisher ist aber der Signalmechanismus des protektiven Effektes von Probiotika letztlich nicht *in-vivo* geklärt. Zu beachten ist auch, dass nicht alle Probiotika äquivalent zueinander sind und demnach unterschiedlich wirken könnten [28].

Ein weiterer Therapie-Ansatz, um die MTX-induzierte Mukositis abzuschwächen, wäre die zusätzliche Supplementierung von Folsäure. MTX ist ein Folsäure-Antagonist, der als Dihydrofolatreduktase-Inhibitor die *de-novo*-Synthese von DNA und RNA verhindert [169]. Durch Gabe von Folsäure könnte die gastrointestinale Toxizität möglicherweise abgemildert werden [172]. Zu bedenken ist jedoch, dass hierbei ein Herabsetzen der Chemotherapie-Effizienz bei der Tumorbekämpfung riskiert werden könnte. Die MTX-Behandlung sollte durch Spiegelmessungen individuell an den Patienten angepasst werden. Eine hohe Dosierung des Chemotherapeutikums kann zu einer Myelosuppression mit erhöhtem Infektionsrisiko führen [179].

Die Daten dieser Dissertation wiesen darauf hin, dass der TLR2-Signalweg möglicherweise ein entscheidender Faktor bei Chemotherapie-induzierten Schäden im humanen Gastrointestinaltrakt ist. Um dieser These noch weiter nachzugehen, wurden humane Biopsien aus dem Duodenum *ex-vivo* in einem präklinischen, dreidimensionalen Modell kurzzeitig kultiviert (Daten hier nicht gezeigt; [52]). Die humanen Biopsien wurden mit oder ohne PCSK und/oder MTX behandelt. Die alleinige MTX-Gabe verursachte signifikante DNA-Schäden in der humanen Lamina Propria sowie einen P-GP-Verlust. TLR2-Stimulation schützte vor MTX-induzierter Toxizität bei gleichzeitigem Erhalt des P-GP-Transporters in den primären Darm-Mukosazellen. Demnach könnte die TLR2-Aktivierung die gastrointestinalen Nebenwirkungen der MTX-Behandlung in Krebs-Patienten mildern.

Jedoch ist der TLR2-Ligand PCSK bisher nicht therapeutisch in einer humanen, klinischen Studie eingesetzt worden. Es muss zukünftig untersucht werden, ob die therapeutische Gabe eines TLR2-Agonisten möglicherweise Nebenwirkungen verursachen könnte. Neben positiven Auswirkungen könnte sich eine längere PCSK-Behandlung möglicherweise negativ auf das Immunsystem auswirken. Eine ständige Aktivierung von TLR2 könnte zu einer Toleranzentwicklung gegenüber dem TLR2-Liganden führen, wodurch eine Abschwächung der Immunantwort verursacht werden könnte.

Der xenobiotische Metabolismus kann unter anderem auch durch genetische Faktoren beeinflusst werden. Daher muss zukünftig analysiert werden, inwieweit Gen-SNP der ABC-Transporter bzw. der CYP450-Gene die individuelle Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapie-induzierten Entzündungen zu modulieren vermögen. SNP im ABCB1/MDR1-Gen könnten möglicherweise die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapie-vermittelten Schäden erhöhen. Bis jetzt existieren keine Studien dazu, ob Polymorphismen von ABCB1/MDR1 die MTX-induzierte Toxizität beeinflussen. Jedoch beschrieben Hoffmeyer *et al.* bereits, dass C3435T-homozygote Patienten eine erniedrigte P-GP-Expression im Duodenum aufweisen, welche mit einem erhöhten Plasmaspiegel des P-GP-Substrats Digoxin einherging [69]. Darüber hinaus zeigten Yang *et al.*, dass der weitere ABCB1/MDR1-Polymorphismus G571A in HEK-Zellen die Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika Vinblastin, Vincristin, Paclitaxel und Etoposid, welche bekannte P-GP-Substrate sind, herabsetzt [224]. Demnach könnten Polymorphismen des ABC-Transporters zu einem Verlust des P-GP-induzierten Efflux von Chemotherapeutika und letztendlich auch zu einer erhöhten Chemotoxizität führen.

Weiterhin müsste untersucht werden, ob TLR2-Polymorphismen die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika modulieren. Unter der kaukasischen Bevölkerung sind 3 bis 10% der Menschen für den R753Q-Polymorphismus des TLR2, bei dem an der Aminosäuresequenz 753 Arginin zu Glutamin mutiert ist, heterozygot [107, 167]. Der TLR2-R753Q-SNP wurde mit der CU-Pancolitis in Verbindung gebracht [148]. Der R753Q-Polymorphismus führte weiterhin zu einer verringerten TLR2-Funktion [107]. Möglicherweise wurde durch Modulation der Tertiärstruktur beim

---

TLR2-R753Q-Polymorphismus das Anbinden von spezifischen Liganden an TLR2 verhindert, wodurch der weitere Signalweg nicht induziert werden konnte [107]. Daher könnte angenommen werden, dass der TLR2-R753Q-Polymorphismus die P-GP-Aktivität vermindert, wodurch Fremdstoffe, wie z.B. MTX, in der Zelle akkumulieren und letztendlich toxisch wirken können. Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass TLR2-R753Q-exprimierende IEC eine Proteasom-abhängige CX43-Degradierung aufweisen [43]. Daher könnte eine TLR2-Mutation zu einer Unterbrechung der *Gap-Junction*-vermittelten Kommunikation mit Folge der gestörten Wundheilung geführt haben [43, 151], wodurch die Progression der MTX-induzierten Mukositis getriggert werden könnte.

Zusammenfassend erbringt die vorliegende Arbeit den ersten Nachweis, dass TLR2 als ein zentraler Regulator der xenobiotischen Abwehr via ABCB1/MDR1-kodiertem P-GP wirkt [52]. Zukünftig könnte die Aktivierung von TLR2 durch PCSK potenziell bei Krebs-Patienten therapeutisch eingesetzt werden, um die Toxizität der Chemotherapie-induzierten Mukositis abzumildern. Weiterhin muss untersucht werden, ob und inwieweit andere TLR den xenobiotischen Metabolismus und assoziierte Signalwege in der intestinalen Mukosa-Barriere modulieren.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die intestinale Mukositis ist die häufigste Nebenwirkung unter zytostatischer Chemotherapie. Die Pathogenese ist jedoch im Detail ungeklärt. Die Chemotherapie-induzierte intestinale Mukositis beeinträchtigt erheblich die Morbidität und damit die Lebensqualität der Krebspatienten und ist bisher nur unzureichend behandelbar.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der angeborenen Immunität durch TLR (Toll-like Rezeptor)-Signalwege in der Pathophysiologie der Chemotherapie-vermittelten intestinalen Mukositis *in-vitro* und *in-vivo* zu analysieren.

Die Tlr2-Defizienz in Mäusen verursachte eine fulminante Methotrexat (MTX)-induzierte Mukositis bei Modulation des xenobiotischen Metabolismus, insbesondere mit Herunterregulation des Abcb1/Mdr1-kodierten P-gp, im murinen Dünndarm. Die Entwicklung der Mukositis wurde funktionell durch den Md-2/Tlr4-Signalweg getriggert. Es wurde *in-vitro* und *in-vivo* gezeigt, dass TLR2 die Expression und die funktionelle Aktivität des P-GP induziert. TLR2-Stimulation durch den spezifischen Liganden Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> x 3HCl (PCSK) führte zum MTX-Efflux via P-GP aus myeloischen Zellen, wodurch die zelluläre Akkumulation und Toxizität von MTX gehemmt wurde. Die bakterielle Diversität des proximalen Jejunums von WT- und TLR2 KO-Mäusen wies keinen signifikanten Unterschied nach MTX-Gabe auf. Mikrobiota-Depletion durch orale Breitbandantibiotika-Behandlung beschleunigte die Progression der Mukositis im Dünndarm von WT-Mäusen, welche mit einem P-gp-Verlust in der intestinalen Mukosa einherging. Orale Supplementierung mit einem spezifischen Tlr2-Liganden in Abx-behandelten WT-Mäusen während der Chemotherapie führte zu einer signifikanten Reduktion der Morbidität bei verringertem genotoxischem Schaden, welcher mit dem Erhalt der P-gp-Expression in mononukleären Zellen der Lamina Propria in der Dünndarm-Mukosa korrelierte. *Ex-vivo*-Versuche bestätigten mechanistisch, dass die Aktivierung des Tlr2-Signalweges bei Mdr1a-Defizienz nicht vor MTX-induzierter Apoptose schützt.

Zusammenfassend erbringt die vorliegende Arbeit den ersten Nachweis, dass TLR2 als ein zentraler Regulator der xenobiotischen Abwehr via P-GP wirkt [52]. Zukünftig könnte die Aktivierung von TLR2 durch PCSK potenziell bei Krebs-Patienten therapeutisch eingesetzt werden, um die Toxizität der Chemotherapie-induzierten

Mukositis abzumildern. Weiterhin muss untersucht werden, ob und inwieweit andere TLR den xenobiotischen Metabolismus und assoziierte Signalwege in der intestinalen Mukosa-Barriere modulieren.

## Summary and future perspective

Intestinal mucositis is the most common side effect of chemotherapy, but the pathogenesis remains to be delineated in detail. Chemotherapy-induced intestinal mucositis impairs morbidity and quality of life of cancer patients and is so far only inadequately treatable.

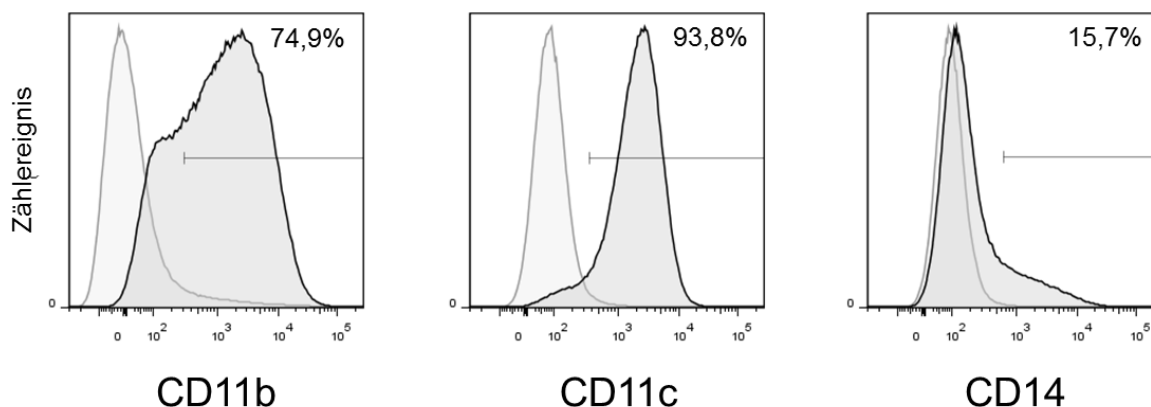
The aim of this study was to investigate the role of innate immunity via Toll-like receptor (TLR) signaling pathways in the pathogenesis of chemotherapy-induced intestinal mucositis *in-vivo* and *in-vitro*.

Deletion of Tlr2 in mice resulted in severe methotrexate (MTX)-induced mucositis in the small intestine with significant gene alterations in xenobiotic metabolism, in particular with decreased expression of Abcb1/Mdr1-encoded P-gp. Mechanistically, aberrant Md-2/Tlr4 signaling accelerated development of mucositis in the context of Tlr2 deficiency. Expression and functional activity of P-GP was significantly induced by TLR2 *in-vitro* and *in-vivo*. Stimulation of TLR2 with Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> x 3HCl (PCSK) induced cellular efflux of MTX out of myeloid cells, thus reducing drug accumulation and toxicity. Studies of commensal composition in the proximal jejunum showed no significant differences between WT and TLR2 KO mice after MTX administration. Depletion of gut microbiota by oral broad-spectrum antibiotics exacerbated progression of small intestinal mucositis in WT mice which correlated with loss of P-gp in the lamina propria. However, supplementation of the TLR2 agonist PCSK suppressed enhanced genotoxicity in antibiotic-treated WT mice under chemotherapy which was associated with preservation of P-gp expression in lamina propria mononuclear cells. In contrast, Tlr2 stimulation failed to protect Mdr1a-deficient small intestinal tissues against MTX-induced apoptosis *ex-vivo*.

In conclusion, these results provide first evidence that TLR2 acts as a central regulator of xenobiotic defence via the ABC transporter in the small intestinal mucosa [52]. Future studies will need to test whether TLR2 activation may represent an efficient therapeutic strategy to reduce genotoxicity in cancer patients under chemotherapy. Furthermore, it must be clarified whether other TLRs may modulate xenobiotic metabolism and associated pathways in the intestinal mucosal barrier.

## 6 Anhang

### 6.1 Monozyten-/Makrophagenmarker in THP-1-Zellen



**Abb. 6.1: Durchflusszytometrische Analyse von THP-1-Zellen auf die Expression verschiedener Monozyten-/Makrophagenmarker.**

Unbehandelte THP-1-Zellen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf ihre Oberflächenexpression von CD11b, CD11c und CD14 untersucht. Die Zellen wurden am Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II gemessen. Tote Zellen wurden mit Hilfe von *Fixable Viability*-Farbstoffen und durch das Setzen von Gates mittels FSC/SSC bei der Auswertung ausgeschlossen. Die prozentuale Anzahl von positiven Zellen wird dargestellt.

### 6.2 Auflistung der MTX-regulierten Gene

**Tabelle 6.1: MTX-regulierte Gene im proximalen Jejunum.**

409 Gene, die bei der *Microarray*-Analyse in den einzelnen Gruppen im Vergleich zum Mittelwert der unbehandelten WT-Mäuse (WT\_C) mehr als achtfach signifikant herunter- oder hochreguliert waren, wurden identifiziert und hier aufgelistet (keine Duplikate). WT: Wildtyp; KO: TLR2 KO; C: unbehandelt; M: MTX-behandelt.

Probe Set ID	Gen	KO_C / WT_C	WT_M / WT_C	KO_M / KO_C	KO_M / WT_M
10563597	Saa3	1,00	1,09	90,80	83,25
10583071	Mmp3	0,93	0,86	51,82	55,96
10344981	Pi15	1,06	1,06	55,09	55,33
10398075	Serpina3n	1,24	1,74	67,74	48,40
10517587	Alpl	1,34	1,23	40,07	43,59
10424683	Ly6g	1,05	1,11	43,10	40,77
10481627	Lcn2	1,39	2,04	57,55	39,20
10451953	Lrg1	0,95	1,06	40,51	36,34
10355500	Igfbp5	1,36	1,18	28,10	32,45
10449000	Msln	1,26	1,27	31,16	30,76
10581605	Hp	0,95	1,08	31,36	27,61
10583100	Mmp8	0,99	1,02	26,74	25,97
10570855	Plat	1,49	1,21	18,83	23,18



10440522	Adamts1	1,60	1,29	18,66	23,04
10424662	Psca	1,69	1,04	13,46	21,90
10398069	Serpina3m	0,93	0,99	22,19	20,75
10453057	Cyp1b1	0,84	1,38	33,61	20,54
10598976	Timp1	0,99	1,25	25,72	20,48
10523175	Ereg	1,91	2,18	22,37	19,57
10469358	Mrc1	1,07	0,82	14,56	18,84
10351551	Adamts4	1,28	1,17	17,17	18,79
10355984	Serpine2	1,38	0,99	13,29	18,43
10505489	Pappa	1,41	1,60	20,67	18,28
10345752	Il1r2	0,95	0,72	12,99	17,08
10538187	Gpnmb	0,70	0,69	16,84	17,04
10414065	Anxa8	1,03	1,06	17,41	17,03
10527649	6330406I15Rik	1,07	1,03	16,36	16,93
10450529	Dpcr1	1,90	0,92	8,06	16,71
10538706	Mmrn1	6,07	0,95	2,57	16,42
10439442	Pla1a	1,04	0,85	13,11	16,10
10608675	Serpina3k	0,94	1,11	18,77	15,92
10390860	Krt23	2,59	1,17	7,14	15,85
10602081	Vsig1	1,02	1,01	15,57	15,70
10404439	Serpinb9b	1,22	1,36	17,25	15,41
10461587	Ms4a4a	1,14	0,76	10,02	15,00
10550906	Plaur	1,18	1,04	13,21	14,94
10540298	Chl1	1,38	1,10	11,77	14,74
10498653	1110032A04Rik	0,84	0,82	14,29	14,66
10398121	Bdkrb1	1,09	1,35	18,21	14,62
10526410	Hspb1	2,01	0,93	6,62	14,31
10549102	Kcnj8	1,35	1,00	10,41	14,13
10416181	Stc1	1,56	0,91	8,07	13,82
10544315		0,97	1,09	15,52	13,76
10528567	Atg9b	1,19	1,22	14,00	13,64
10519857	Hgf	1,04	1,21	15,66	13,43
10572897	Hmox1	1,67	1,08	8,68	13,42
10532741	Tmem119	1,08	0,96	11,86	13,25
10375175	Slit3	1,65	1,69	13,34	13,06
10458894	Lox	0,84	1,15	17,73	12,92
10509584	Pla2g2a	1,38	0,70	6,37	12,56
10401841	Dio2	0,96	0,86	11,24	12,51
10466210	Ms4a6d	1,23	0,82	8,35	12,50
10427436	C7	1,15	1,16	12,61	12,43
10603151	Gpm6b	1,44	1,15	9,92	12,38
10569335	H19	0,98	1,05	13,18	12,26
10375608	Scgb3a1	1,19	0,92	9,41	12,24
10466606	Anxa1	1,20	1,30	13,19	12,19
10509992	Hspb7	1,10	1,13	12,27	11,98
10575976	Crispld2	1,41	1,08	9,15	11,93
10563350	Fut2	1,16	1,71	17,51	11,92
10454154	Dsg3	0,99	0,97	11,63	11,92

10541644	Cd163	1,08	1,09	11,94	11,83
10439009	Apod	1,46	1,15	9,34	11,79
10449666	Tff1	0,93	0,87	10,99	11,67
10474700	Thbs1	1,37	1,06	8,95	11,58
10360040	Fcgr3	1,11	0,82	8,44	11,42
10531887	Slc10a6	1,10	1,04	10,73	11,36
10349108	Serpib5	1,60	1,06	7,46	11,28
10367400	Mmp19	1,09	1,23	12,67	11,27
10366707	Avpr1a	1,41	1,02	8,07	11,18
10449284	Dusp1	2,19	0,83	4,22	11,07
10499899	Spr1a	1,82	0,85	5,08	10,94
10556509	Spon1	1,02	1,07	11,25	10,77
10484307	Frzb	1,06	1,18	11,62	10,49
10582275	Slc7a5	2,88	1,27	4,61	10,45
10367772	Samd5	1,60	1,10	7,12	10,34
10433885	Cebpd	1,35	1,10	8,41	10,33
10379524	Ccl11	1,28	0,95	7,59	10,26
10583870	Bmper	1,19	1,16	9,91	10,21
10578045		1,52	1,73	11,50	10,11
10470392	Adamtsl2	1,06	1,09	10,36	10,11
10351206	Selp	1,13	1,14	10,21	10,09
10511779	Atp6v0d2	1,05	1,13	10,85	10,03
10491699	Fgf2	1,13	0,94	8,35	10,00
10367582	Vip	1,44	0,87	5,99	9,95
10469816	Il1rn	1,08	1,17	10,74	9,95
10407350	Fgf10	1,12	1,09	9,69	9,91
10446473	Lama1	1,05	1,58	14,86	9,86
10523120	Cxcl5	1,09	0,98	8,85	9,82
10567355	Gprc5b	1,06	0,95	8,82	9,81
10498024	Slc7a11	1,58	1,17	7,23	9,80
10530029	Lgi2	1,21	0,96	7,75	9,76
10523134	Pf4	1,12	0,85	7,35	9,68
10363070	Gp49a	1,10	1,03	9,06	9,68
10410931	Vcan	1,33	1,93	13,90	9,61
10460585	Fosl1	1,46	1,06	6,77	9,32
10408693	F13a1	1,49	0,91	5,68	9,30
10359282	Pappa2	1,28	1,51	10,87	9,25
10345762	Il1r1	1,11	1,13	9,29	9,14
10427035	Nr4a1	2,04	1,39	6,24	9,12
10485948	Grem1	1,37	1,43	9,47	9,09
10558961	Tspan4	1,18	1,27	9,72	9,05
10578649	Odz3	1,10	0,98	8,05	9,01
10347767	Kcne4	1,21	1,10	8,08	8,92
10493870	Spr2f	1,11	1,19	9,53	8,91
10418835	Slc18a3	1,18	1,15	8,63	8,88
10427049	6030408B16Rik	1,11	1,11	8,82	8,87
10370259	Col18a1	1,23	1,82	13,09	8,84
10486875	Frmd5	1,04	1,21	10,19	8,81

10570434	Ifitm1	1,46	1,76	10,37	8,58
10559667	Il11	1,31	1,29	8,43	8,57
10360028	Fcgr2b	1,20	1,11	7,88	8,49
10546454	Adamts9	1,82	1,39	6,43	8,42
10433114	Itga5	1,23	1,74	11,73	8,33
10555280	Chrdl2	1,47	0,97	5,44	8,29
10462442	Il33	0,82	1,23	12,15	8,06
10381096	Igfbp4	1,26	1,20	7,57	7,93
10396952	Ttc9	1,44	1,17	6,44	7,93
10503334	Gem	1,36	1,32	7,64	7,88
10487645	Cpxm1	1,13	1,27	8,58	7,67
10381122	Fkbp10	1,31	1,50	8,78	7,65
10523359	Cxcl13	1,17	1,72	11,09	7,50
10478884	Snai1	1,35	1,14	6,24	7,40
10607089	Acs14	1,26	1,31	7,61	7,36
10593225	Zbtb16	1,00	1,68	12,15	7,23
10485624	Prrg4	1,58	1,42	6,36	7,07
10421737	Tnfsf11	1,18	1,22	7,27	7,06
10452419	Efna5	1,27	1,19	6,59	7,04
10361234	Hsd11b1	1,07	1,41	9,28	7,02
10521824	Sod3	1,17	1,16	6,97	7,02
10427471	Osmr	1,23	1,15	6,54	7,01
10532085	Tgfb3	1,22	1,40	7,89	6,91
10570957	Sfrp1	1,40	1,29	6,35	6,86
10491970	Lhfp	1,37	1,18	5,84	6,81
10362201	Ctgf	1,66	1,62	6,62	6,81
10429520	Ly6d	1,34	1,22	6,13	6,78
10455687	Prr16	1,29	1,20	6,21	6,68
10448307	Tnfrsf12a	2,05	1,45	4,68	6,61
10441680	Pde10a	1,12	1,25	7,30	6,56
10375065	Sh3pxd2b	1,22	1,34	7,12	6,49
10493820	S100a6	2,12	3,01	8,95	6,32
10508829	Map3k6	1,85	1,39	4,72	6,28
10456400	Tubb6	1,52	1,43	5,77	6,14
10495675	F3	1,29	1,44	6,80	6,10
10418171	Zcchc24	1,41	1,40	5,78	5,84
10358816	Lamc1	1,45	1,69	6,80	5,81
10435641	Fstl1	1,30	1,57	6,99	5,79
10548879	Mgp	1,29	1,50	6,67	5,73
10369290	Ddit4	1,84	2,34	7,16	5,64
10534343	El1n	1,33	1,83	7,67	5,55
10354309	Col5a2	1,39	1,54	5,98	5,38
10450242	C4b	1,11	2,51	11,44	5,05
10416215	Loxl2	1,46	1,79	6,06	4,96
10595211	Col12a1	1,34	2,06	7,52	4,87
10401114	Rab15	1,64	1,95	5,58	4,70
10578857	Anxa10	1,24	13,46	48,81	4,49
10449452	Fkbp5	0,94	3,05	14,05	4,32

10404359	Mboat1	1,49	6,32	17,39	4,09
10523451	Anxa3	1,24	2,21	7,28	4,08
10474526	Lpcat4	1,55	3,09	6,67	3,35
10569437	Phlda2	1,69	3,75	6,40	2,89
10537146	Akr1b8	1,01	4,53	12,41	2,78
10496727	Ddah1	1,40	5,99	11,49	2,69
10375051	Hba-a1, Hba-a2	2,52	0,06	0,02	0,74
10490913	Car3	0,31	0,13	0,23	0,57
10566254	Hbb-b1, Beta-s, Hbb-b2	2,46	0,05	0,01	0,52
10531073	Ugt2b38	1,30	0,33	0,07	0,29
10412211	Gzma	0,62	0,50	0,19	0,24
10580678	Ces1g	0,57	0,42	0,17	0,23
10420308	Gzmb	0,74	0,46	0,14	0,22
10543895	2010107G12Rik	1,21	0,38	0,07	0,21
10403821		0,91	0,57	0,13	0,20
10407940		0,87	0,64	0,13	0,18
10489391	Ada	1,47	0,59	0,07	0,17
10593646	Tnfaip8l3	0,92	0,74	0,13	0,16
10367059	Bc089597	1,00	0,57	0,09	0,16
10521892	Slc34a2	0,82	0,70	0,12	0,14
10352501	Mir215	0,53	0,41	0,11	0,14
10367041	Rdh9	0,98	0,75	0,10	0,13
10425037	Apol10a	0,82	0,57	0,09	0,13
10373600	Mettl7b	1,07	0,80	0,09	0,12
10545881	Cml2	0,92	0,60	0,08	0,12
10433241	Dnase1	0,87	0,92	0,12	0,12
10406176	Slc9a3	1,00	0,83	0,09	0,11
10482929	Ly75	1,09	1,09	0,11	0,11
10571840	Hpgd	1,30	1,07	0,09	0,11
10352499	Mir194-1	0,67	0,54	0,09	0,11
10430174	Apol9a	1,42	1,12	0,09	0,11
10550749	Nlrp9b	1,17	1,12	0,11	0,11
10385893	Slc22a4	1,08	0,91	0,09	0,11
10550740	Ceacam20	1,20	0,94	0,08	0,11
10548011	Plekhg6	1,17	1,15	0,10	0,11
10566366	Trim30d	1,18	1,14	0,10	0,10
10483679	Gpr155	1,23	0,96	0,08	0,10
10469923	Entpd8	1,12	1,14	0,10	0,10
10501074	Cym	0,88	0,66	0,07	0,10
10348902	Gm9994, Gal3st2	1,24	1,23	0,10	0,10
10531034	Ugt2b34	1,41	1,23	0,08	0,10
10491091	Tnfsf10	1,02	1,01	0,09	0,10
10388254	Aspa	1,07	1,20	0,11	0,09
10344924	Xkr9	1,25	1,33	0,10	0,09
10348896	Gal3st2, Gm9994	1,21	1,22	0,09	0,09
10522661	C530008M17Rik	1,24	1,29	0,10	0,09
10552451	Ceacam18	1,59	1,08	0,06	0,09
10568709	Clrn3	1,31	1,22	0,09	0,09

10432032	Vdr	1,53	1,36	0,08	0,09
10607705	S100g	1,29	0,64	0,04	0,09
10470751	Slc27a4	1,20	1,30	0,10	0,09
10363372	Pla2g12b	1,33	1,33	0,09	0,09
10431558	Odf3b	1,21	1,11	0,08	0,09
10538373	Prr15	1,25	1,20	0,08	0,09
10557165	2010110P09Rik	1,21	1,31	0,09	0,09
10603746	Maob	1,28	1,33	0,09	0,09
10574511	Ces2b	0,89	0,49	0,05	0,09
10531051	Ugt2b36	1,23	1,31	0,09	0,09
10535524	Ocm	1,11	0,81	0,06	0,08
10531588	Prkg2	1,01	1,47	0,12	0,08
10467041	Asah2	1,39	1,30	0,08	0,08
10592752	Pdzd3	1,12	1,40	0,10	0,08
10444788	H2-Q1	1,39	1,28	0,08	0,08
10545886	1700019G17Rik	1,23	1,33	0,09	0,08
10425049	Apol9b	1,52	1,29	0,07	0,08
10557300	Aqp8	0,43	0,52	0,10	0,08
10559606	Tmem86b	1,02	1,25	0,10	0,08
10448743	Fahd1	1,11	1,58	0,11	0,08
10447084	Galm	1,29	1,33	0,08	0,08
10483046	Dpp4	1,39	1,38	0,08	0,08
10514912	Dio1	1,13	0,37	0,03	0,08
10552193	Slc7a9	1,26	1,38	0,08	0,08
10363622	Pbld2	0,94	1,27	0,10	0,08
10545877	Nat8	1,75	1,52	0,07	0,08
10408861	9530008L14Rik	1,18	1,53	0,10	0,08
10537169	Akr1b7	0,58	1,58	0,20	0,07
10380566	Phospho1, Zfp652	0,92	1,22	0,10	0,07
10522819	Ugt2b35	1,12	1,06	0,07	0,07
10464772	2010003K11Rik	1,03	0,97	0,07	0,07
10570308	Proz	0,94	1,36	0,10	0,07
10450197	Btnl5	1,31	1,35	0,07	0,07
10450704		1,10	1,04	0,07	0,07
10408251	Slc17a4	0,95	0,95	0,07	0,07
10447239	Abcg8	1,13	1,09	0,07	0,07
10603425	Glod5	1,49	1,69	0,08	0,07
10499329	Rhbg	1,29	1,49	0,08	0,07
10463308	Abcc2	1,36	1,59	0,08	0,07
10495820	Fabp2	1,58	1,76	0,08	0,07
10438423	Olfr165	1,07	1,19	0,08	0,07
10383047	Enpp7	0,97	1,51	0,11	0,07
10461526	Vwce	1,12	1,82	0,11	0,07
10561128	Cyp2s1	1,46	1,79	0,08	0,07
10588043	Rbp2	1,41	1,61	0,08	0,07
10580649	Ces1e	1,11	1,83	0,11	0,07
10460696	Slc25a45	1,30	1,19	0,06	0,07
10521667	Bst1	0,98	0,81	0,05	0,07

10356145	Slc19a3	1,20	1,24	0,07	0,07
10385814	Leap2	1,22	1,86	0,10	0,06
10572271	Tm6sf2	1,54	1,51	0,06	0,06
10446553	Epb4.1l3	1,09	1,36	0,08	0,06
10463343	Gm10768	0,99	1,54	0,10	0,06
10467385	Cyp2c68	0,92	1,49	0,10	0,06
10368720	Slc16a10	1,13	1,33	0,07	0,06
10494536	Pdzk1	1,15	1,21	0,06	0,06
10398649	1200009l06Rik	1,11	0,95	0,05	0,06
10566578	Gm8979	1,30	1,85	0,08	0,06
10453318	Abcg5	0,96	1,06	0,07	0,06
10463430	Sema4g	1,26	2,08	0,10	0,06
10381528	Nags	1,15	1,42	0,07	0,06
10524422	Dao	1,19	1,25	0,06	0,06
10352548	Slc30a10	1,30	0,70	0,03	0,06
10379184	Slc46a1	1,03	1,02	0,06	0,06
10462484	A1cf	1,41	1,43	0,06	0,06
10545874	Cml5	1,10	1,66	0,08	0,06
10599463	Xpnpep2	1,66	1,72	0,06	0,06
10569962	Ccl25	1,30	1,54	0,07	0,06
10517609	Cda	1,57	1,40	0,05	0,06
10574532	Ces2d-ps	1,41	1,28	0,05	0,05
10349580	Pigr	1,35	1,45	0,06	0,05
10498710	Bche	1,66	1,46	0,05	0,05
10369567	Hkdc1	1,13	1,39	0,06	0,05
10460072	Cndp1	0,91	1,24	0,07	0,05
10594519	Ostb	1,21	1,13	0,05	0,05
10456361	Gm9926	1,11	1,66	0,08	0,05
10466165		1,32	1,62	0,06	0,05
10395414	Agmo	1,30	1,22	0,05	0,05
10469453		1,41	0,99	0,04	0,05
10598771	Maoa	1,25	1,82	0,07	0,05
10383819	Sec14l2	1,08	1,46	0,07	0,05
10431546	Tymp	1,24	1,11	0,04	0,05
10509596	Rnf186	1,47	1,84	0,06	0,05
10384102	Npc1l1	1,47	0,97	0,03	0,05
10451016	Mep1a	1,40	1,27	0,04	0,05
10439068	Osta	1,12	1,30	0,06	0,05
10521038	Slc5a1	1,32	1,38	0,05	0,05
10565786	Mogat2	1,51	1,55	0,05	0,05
10531057	Ugt2b5	0,76	1,11	0,07	0,05
10589166	Slc26a6	1,06	1,06	0,05	0,05
10593473	1810046K07Rik	1,46	1,77	0,06	0,05
10506452	Ay512949	1,71	1,09	0,03	0,05
10384378	Ddc	1,38	1,65	0,06	0,05
10598203	Ccl28	1,66	2,24	0,06	0,05
10502081	Enpep	1,12	1,59	0,07	0,05
10574524		1,32	1,23	0,04	0,05

10520612	Khk	1,23	1,34	0,05	0,05
10454212	Mep1b	1,23	1,37	0,05	0,05
10440433	Tmprss15	0,41	0,71	0,08	0,05
10531087	Sult1b1	1,35	1,31	0,04	0,05
10510516	Slc2a5	0,94	1,52	0,07	0,05
10450199		0,89	1,01	0,05	0,05
10388718	Pipox	1,37	1,05	0,03	0,05
10447264	Slc3a1	1,35	1,41	0,05	0,05
10514421	Lrrc19	1,40	1,33	0,04	0,04
10463023	Cyp2c66	1,12	1,07	0,04	0,04
10444802	H2-Q2	1,38	1,09	0,03	0,04
10500555	Hsd3b3	1,27	1,49	0,05	0,04
10359561	Fmo4	1,18	1,62	0,06	0,04
10480155	Cubn	1,24	0,47	0,02	0,04
10403312	Akr1c19	0,84	1,84	0,09	0,04
10445347	Clic5	1,13	1,53	0,06	0,04
10574545	Ces2e	1,47	1,46	0,04	0,04
10469436		1,28	1,00	0,03	0,04
10497296	Slc10a5	1,31	1,64	0,05	0,04
10531100	Sult1d1	1,37	1,27	0,04	0,04
10408647		1,24	1,44	0,05	0,04
10534301	Syna	1,26	1,86	0,06	0,04
10494565	Fmo5	1,30	1,57	0,05	0,04
10396831	Arg2	1,62	1,48	0,04	0,04
10402353	Ifi2712b	1,29	0,99	0,03	0,04
10365127	2210404O07Rik	1,67	1,41	0,03	0,04
10450167		1,22	1,39	0,04	0,04
10406564	Acot12	1,06	1,01	0,03	0,04
10463005	Cyp2c55	0,98	1,03	0,04	0,04
10444312	Btnl2	1,14	1,05	0,03	0,04
10403285	Tuba13	1,15	1,33	0,04	0,04
10548326	Clec2e	1,28	1,14	0,03	0,04
10539393	Slc4a5	1,15	1,77	0,05	0,04
10423049	Prhr	1,28	1,57	0,04	0,04
10347117	Cps1	1,75	1,84	0,04	0,03
10368700	G630090E17Rik	1,28	1,97	0,05	0,03
10469353	Tmem236	1,35	1,17	0,03	0,03
10364134	Slc5a4a	0,83	0,79	0,03	0,03
10506433	Dab1	1,39	0,97	0,02	0,03
10368317	Enpp3	1,33	1,09	0,03	0,03
10495625	Dpyd	1,33	1,32	0,03	0,03
10416689	Olfm4	1,51	1,41	0,03	0,03
10399365	Slc7a15	1,08	1,21	0,04	0,03
10450733	Gm7030	1,25	0,90	0,02	0,03
10492355	Mme	1,33	1,30	0,03	0,03
10386683	Slc47a1	1,01	1,90	0,06	0,03
10501208	Gstm6	1,22	1,52	0,04	0,03
10395201	Slc26a3	1,91	1,71	0,03	0,03

10373334	Hsd17b6	0,93	0,98	0,03	0,03
10551836	Cox7a1	1,39	1,60	0,04	0,03
10490755	Hnf4g	1,44	1,49	0,03	0,03
10378816	Slc6a4	1,51	1,48	0,03	0,03
10512145	Aqp7	1,41	0,96	0,02	0,03
10557262	Slc5a11	1,08	1,27	0,03	0,03
10420935	Ephx2	1,19	1,40	0,03	0,03
10351533	Nr1i3	1,03	1,69	0,05	0,03
10510532	Slc2a7	0,91	1,34	0,04	0,03
10479047	Pck1	1,29	2,04	0,04	0,03
10403291	Akr1c14	1,32	1,87	0,04	0,03
10430909	Cyp2d26	1,39	1,42	0,03	0,03
10382492	Otop3	0,59	0,75	0,03	0,03
10593169	Apoc3	1,45	1,18	0,02	0,03
10368695	2010001E11Rik	1,23	1,46	0,03	0,02
10467390	Cyp2c40, Cyp2c67, Cyp2c68, Cyp2c69	1,14	1,41	0,03	0,02
10410530	Slc6a19	1,29	0,98	0,02	0,02
10603066	Ace2	1,39	1,23	0,02	0,02
10460746	Naaladl1	1,33	0,75	0,01	0,02
10449940	Cyp4f14	1,56	1,59	0,02	0,02
10410007	Fbp1	1,35	1,07	0,02	0,02
10388834	Slc13a2	0,61	3,26	0,12	0,02
10496447	Adh6a	1,46	1,37	0,02	0,02
10400072	Scin	1,27	1,98	0,03	0,02
10404071	Trim38	0,96	1,32	0,03	0,02
10447904	Unc93a, Gm9992	0,92	1,33	0,03	0,02
10542112	Clec2h	1,42	1,34	0,02	0,02
10593332	Bco2	0,89	1,47	0,03	0,02
10492300	Aadac	0,84	1,85	0,05	0,02
10447634	Gm9992, Unc93a	0,89	1,32	0,03	0,02
10422412	Slc15a1	1,21	1,14	0,02	0,02
10444320	Btnl1	1,26	1,31	0,02	0,02
10535704	Cyp3a11	1,08	1,07	0,02	0,02
10558742	Nlrp6	1,21	1,67	0,03	0,02
10498659	Sis	1,59	1,57	0,02	0,02
10527494	Cyp3a25, Cyp3a59, Cyp3a57	0,83	1,20	0,03	0,02
10463027	Cyp2c29	0,36	0,89	0,04	0,02
10381387	G6pc	1,17	1,34	0,02	0,02
10538163	Abp1	1,32	1,41	0,02	0,02
10450735	H2-T3, LOC100862459, LOC633417, H2-T18	1,26	1,13	0,02	0,02
10543411	Slc13a1	0,78	1,14	0,02	0,02
10554502	Slc28a1	1,29	1,34	0,02	0,02
10574498	Ces2a	0,86	0,98	0,02	0,01
10370054	Slc5a4b	1,31	2,63	0,03	0,01
10389261	Gm11437	1,33	1,86	0,02	0,01
10373330	Rdh7	1,34	1,54	0,02	0,01



10362511	Gstm3	1,38	1,53	0,01	0,01
10584787	Treh	1,20	1,24	0,01	0,01
10535714	Cyp3a25	1,18	1,31	0,01	0,01
10475653	Slc27a2	0,97	1,38	0,02	0,01
10598612	Otc	1,33	1,67	0,01	0,01
10531066	Ugt2a3	1,19	1,11	0,01	0,01
10597960	Slc6a20a	1,35	1,30	0,01	0,01
10496466	Adh4	0,84	2,54	0,03	0,01
10491171	Slc2a2	1,34	1,37	0,01	0,01
10601484	2010106E10Rik	1,28	1,14	0,01	0,01
10551197	Cyp2b10	1,19	1,19	0,01	0,01
10394060	Sectm1b	1,19	1,02	0,01	0,01
10501218	Gstm3	1,24	1,34	0,01	0,01
10357418	Lct	1,38	0,87	0,00	0,01

### 6.3 MTX-regulierte Gene des xenobiotischen Metabolismus

**Tabelle 6.2: MTX-regulierte Gene im proximalen Jejunum von behandelten TLR2 KO-Mäusen im Vergleich zu behandelten WT-Mäusen.**

Die *Microarray*-Analyse zeigte eine mehr als achtfache Regulation von 140 Genen im proximalen Jejunum von TLR2 KO-Mäusen nach MTX-Gabe, verglichen mit MTX-behandelten WT-Mäusen, die ein xenobiotisches Metabolismus besaßen. Die Obergrenze der  $\log_2$ -Einstellung wurde auf 4,0 eingestellt. Die folgende Tabelle führt die identifizierten Gene auf.

Gen	Entrez Gene Name	Probe Set ID	Log <sub>2</sub> -Einstellung
Saa1	--	10563597	6,427
Mmp3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, procollagenase)	10583071	5,763
Pi15	peptidase inhibitor 15	10344981	5,713
Serpina3	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, member 3)	10398075	5,593
Alpl	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	10517587	5,454
Lcn2	lipocalin 2	10481627	5,377
Lrg1	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	10451953	5,134
Igfbp5	insulin-like growth factor binding protein 5	10355500	5,078
Msln	mesothelin	10449000	4,888
Hp	haptoglobin	10581605	4,740
Plat	plasminogen activator, tissue	10570855	4,511
Adamts1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1	10440522	4,478
Cyp1b1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	10453057	4,417
PscA	prostate stem cell antigen	10424662	4,415

Timp1	TIMP metallopeptidase inhibitor 1	10598976	4,383
Ereg	epiregulin	10523175	4,329
Mrc1	mannose receptor, C type 1	10469358	4,268
Pappa	pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1	10505489	4,219
Adamts4	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 4	10351551	4,205
Serpine2	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	10355984	4,163
Gpnmb	glycoprotein (transmembrane) nmb	10538187	4,083
Medag	mesenteric estrogen-dependent adipogenesis	10527649	4,023
Ms4a4a	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A	10461587	4,018
Il1r2	interleukin 1 receptor, type II	10345752	4,013
Cyp4a11	--	10507163	-4,000
Ccl25	chemokine (C-C motif) ligand 25	10569962	-4,010
Slc46a1	solute carrier family 46, member 1	10379184	-4,039
Cda	cytidine deaminase	10517609	-4,041
Cml5	camello-like 5	10545874	-4,065
	polymeric immunoglobulin receptor	10349580	-4,094
Bche	butyrylcholinesterase	10498710	-4,112
Hkdc1	hexokinase domain containing 1	10369567	-4,117
Cndp1	carnosine dipeptidase 1 (metallopeptidase M20 family)	10460072	-4,118
Slc51b	solute carrier family 51, beta subunit	10594519	-4,118
Agmo	--	10395414	-4,144
Ugt2b17	--	10531057	-4,146
Slc51a	solute carrier family 51, alpha subunit	10439068	-4,162
Sec14l2	SEC14-like 2 ( <i>S. cerevisiae</i> )	10383819	-4,162
Rnf186	ring finger protein 186	10509596	-4,169
Maoa	monoamine oxidase A	10598771	-4,175
Mep1a	meprin A, alpha (PABA peptide hydrolase)	10451016	-4,193
Mogat2	monoacylglycerol O-acyltransferase 2	10565786	-4,197
C11orf53	chromosome 11 open reading frame 53	10593473	-4,212
Npc111 (includes EG:100329429)	--	10384102	-4,219
Ces2b/Ces2c	carboxylesterase 2C	10574524	-4,246
Slc5a1	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1	10521038	-4,265
Ddc	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	10384378	-4,267
Ccl28	chemokine (C-C motif) ligand 28	10598203	-4,274

Slc26a6	solute carrier family 26 (anion exchanger), member 6	10589166	-4,299
Sult1b1	sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1	10531087	-4,302
Mep1b	--	10454212	-4,303
Pipox	pipecolic acid oxidase	10388718	-4,312
Khk	ketohehexokinase (fructokinase)	10520612	-4,318
Enpep	glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)	10502081	-4,322
Slc2a5	solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5	10510516	-4,326
Prepl	prolyl endopeptidase-like	10447264	-4,347
Tmprss15	transmembrane protease, serine 15	10440433	-4,349
Fmo4	flavin containing monooxygenase 4	10359561	-4,353
Hsd3b3	--	10500555	-4,354
Lrrc19	leucine rich repeat containing 19	10514421	-4,375
Hla-b	--	10444802	-4,379
Cubn	cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	10480155	-4,405
Akr1c19	aldo-keto reductase family 1, member C19	10403312	-4,410
Clic5	chloride intracellular channel 5	10445347	-4,423
Syna	syncytin a	10534301	-4,424
Cyp2c8	--	10463023	-4,449
Ces2e	carboxylesterase 2E	10574545	-4,467
Sult1d1	sulfotransferase family 1D, member 1	10531100	-4,509
Fmo5	flavin containing monooxygenase 5	10494565	-4,579
Slc4a5	solute carrier family 4 (sodium bicarbonate cotransporter), member 5	10539393	-4,585
Cyp2c18	--	10463005	-4,598
Acot12	acyl-CoA thioesterase 12	10406564	-4,599
Prlr	prolactin receptor	10423049	-4,610
Arg2	arginase 2	10396831	-4,611
Tuba13	tubulin, alpha-like 3	10403285	-4,634
Btln2	butyrophilin-like 2 (MHC class II associated)	10444312	-4,657
Dab1	Dab, reelin signal transducer, homolog 1 (Drosophila)	10506433	-4,710
Slc7a15	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 15	10399365	-4,720
Cps1	carbamoyl-phosphate synthase 1, mitochondrial	10347117	-4,754
Dpyd	dihydropyrimidine dehydrogenase	10495625	-4,760
Gm7030	--	10450733	-4,787
Slc47a1	solute carrier family 47 (multidrug and toxin extrusion), member 1	10386683	-4,802

Olfm4	olfactomedin 4	10416689	-4,809
Slc5a4	solute carrier family 5 (glucose activated ion channel), member 4	10364134	-4,816
Enpp3	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	10368317	-4,826
Gstm6	glutathione S-transferase, mu 6	10501208	-4,842
Mme	membrane metallo-endopeptidase	10492355	-4,843
Slc26a3	solute carrier family 26 (anion exchanger), member 3	10395201	-4,859
Slc6a4	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 4	10378816	-4,874
Cox7a1	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle)	10551836	-4,898
Hsd17b6	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6	10373334	-4,913
Nr1i3	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3	10351533	-4,934
Hnf4g	hepatocyte nuclear factor 4, gamma	10490755	-4,936
Akr1c14	aldo-keto reductase family 1, member C14	10403291	-4,947
Aqp7	aquaporin 7	10512145	-4,951
Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	10479047	-4,958
Ephx2	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	10420935	-4,973
Otop3	otopetrin 3	10382492	-5,082
Kiaa1919	KIAA1919	10368695	-5,146
Apoc3	--	10593169	-5,154
Cyp2d26	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 26	10430909	-5,159
Naaladl1	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 1	10460746	-5,188
Slc6a19	solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 19	10410530	-5,188
Ace2	angiotensin I converting enzyme 2	10603066	-5,225
Slc13a2	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 2	10388834	-5,249
Fbp1	fructose-1,6-bisphosphatase 1	10410007	-5,254
Scin	scinderin	10400072	-5,305
Trim38	tripartite motif containing 38	10404071	-5,307
Cyp4f12	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 12	10449940	-5,327
Aadac	arylacetamide deacetylase	10492300	-5,366
Bco2	beta-carotene oxygenase 2	10593332	-5,381
Adh6a	alcohol dehydrogenase 6A (class V)	10496447	-5,393
Unc93a	unc-93 homolog A (C. elegans)	10447634	-5,422

Clec2e/Clec2h	--	10542112	-5,425
Slc15a1	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1	10422412	-5,480
Nlrp6	NLR family, pyrin domain containing 6	10558742	-5,502
Cyp3a4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	10535704	-5,541
Cyp2c8	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8	10463027	-5,611
Si	sucrase-isomaltase (alpha-glucosidase)	10498659	-5,655
H2-t3	histocompatibility 2, T region locus 3	10450735	-5,687
G6pc	glucose-6-phosphatase, catalytic subunit	10381387	-5,698
Aoc1	amine oxidase, copper containing 1	10538163	-5,787
Slc28a1	solute carrier family 28 (concentrative nucleoside transporter), member 1	10554502	-5,820
Slc13a1	solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporter), member 1	10543411	-5,834
Ces2a	carboxylesterase 2A	10574498	-5,896
Slc5a4b	solute carrier family 5 (neutral amino acid transporters, system A), member 4b	10370054	-5,951
Rdh7	--	10373330	-6,007
Treh	trehalase (brush-border membrane glycoprotein)	10584787	-6,087
Otc	ornithine carbamoyltransferase	10598612	-6,228
Cyp3a43	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 43	10535714	-6,241
Slc27a2	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	10475653	-6,276
Ugt2a3	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide A3	10531066	-6,284
Adh4	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	10496466	-6,425
Slc6a20	solute carrier family 6 (proline IMINO transporter), member 20	10597960	-6,431
Slc2a2	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2	10491171	-6,533
Cyp2b6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	10551197	-6,692
Lct	lactase	10357418	-7,224
Gstm3	glutathione S-transferase, mu 3	10501218	-7,253

**Tabelle 6.3: Identifizierung des kanonischen Signalweges der 140 identifizierten MTX-regulierten Gene im proximalen Jejunum von WT- und TLR2 KO-Mäusen.**

Die 140 identifizierten Gene wurden auf ihren Einfluss auf kanonische Signalwege mittels *Ingenuity*<sup>®</sup> untersucht und unterteilt. Die Anzahl der identifizierten Gene, die mit dem jeweiligen Metabolismus assoziiert werden, wie auch die Anzahl aller dem Signalweg zugehörenden Gene wurden dargestellt.

Metabolismus	Signifikant regulierte Gene	KO_M vs. WT_M
Metabolismus der Xenobiotika durch Cytochrome P450	Cyp2c8, Cyp2d26, Adh6a, Cyp1b1, Cyp3a43, Cyp3a4, Cyp2c18, Gstm6, Gstm3, Ugt2a3, Ugt2b17, Cyp4f12, Cyp2b6, Adh4 (includes EG:127), Cyp2c29 (includes others)	15/196
Tryptophan-Metabolismus	CYP2C8, Cyp2d26, DDC, BCO2, CYP1B1, CYP3A43, CYP2C18, CYP3A4, CYP4F12, CYP2B6, ABP1 (includes EG:26), MAOA, Cyp2c29 (includes others), ADH4 (includes EG:127)	14/235
Fettsäure-Metabolismus	CYP2C8, Cyp2d26, SLC27A2, Adh6a, CYP1B1, CYP3A43, CYP2C18, CYP3A4, CYP4F12, CYP2B6, CYP4A11, Cyp2c29 (includes others), ADH4 (includes EG:127)	13/183
Arachidonsäure-Metabolismus	CYP3A43, CYP2C8, Cyp2d26, CYP2C18, CYP3A4, BCO2, CYP4F12, CYP2B6, CYP4A11, CYP1B1, Cyp2c29 (includes others)	11/206
Xenobiotischer Metabolismus	Ces2a, CYP2C8, FMO5, Sult1d1, CYP1B1, CYP3A4, Gstm3, Ces2e, NR1I3, UGT2B17, CYP2B6, FMO4, SULT1B1, MAOA, Ces2b/Ces2c	15/295
Linolen-Metabolismus	CYP3A43, CYP2C8, Cyp2d26, CYP2C18, CYP3A4, CYP4F12, CYP2B6, CYP1B1, Cyp2c29 (includes others)	9/209
LPS/II-1-vermittelte Inhibierung der Rxr-Funktion	CYP2C8, SLC27A2, Sult1d1, FMO5, IL1R2, CYP3A4, Gstm3, NR1I3, CYP2B6, FMO4, CYP4A11, SULT1B1, MAOA	13/236
Stärke- und Saccharose-Metabolismus	ENPP3, UGT2A3, SI, UGT2B17, G6PC, TREH	6/166

## 7 Literaturverzeichnis

1. **Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., et al.** (2009). "Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding." *Science* 323(5922):1718-22.
2. **Ambudkar, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E. and Gottesman, M. M.** (2003). "P-glycoprotein: from genomics to mechanism." *Oncogene* 22(47):7468-85.
3. **Annese, V., Valvano, M. R., Palmieri, O., Latiano, A., Bossa, F. and Andriulli, A.** (2006). "Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis." *World J Gastroenterol* 12(23):3636-44.
4. **Bain, C. C. and Mowat, A. M.** (2014). "Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation." *Immunol Rev* 260(1):102-17.
5. **Bansal, T., Jaggi, M., Khar, R. K. and Talegaonkar, S.** (2009). "Emerging significance of flavonoids as P-glycoprotein inhibitors in cancer chemotherapy." *J Pharm Pharm Sci* 12(1):46-78.
6. **Barancik, M., Bohacova, V., Kvackajova, J., Hudecova, S., Krizanova, O. and Breier, A.** (2001). "SB203580, a specific inhibitor of p38-MAPK pathway, is a new reversal agent of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance." *Eur J Pharm Sci* 14(1):29-36.
7. **Beck, P. L., Wong, J. F., Li, Y., Swaminathan, S., Xavier, R. J., Devaney, K. L., et al.** (2004). "Chemotherapy- and radiotherapy-induced intestinal damage is regulated by intestinal trefoil factor." *Gastroenterology* 126(3):796-808.
8. **Berger, S. B., Romero, X., Ma, C., Wang, G., Faubion, W. A., Liao, G., et al.** (2010). "SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages." *Nat Immunol* 11(10):920-7.
9. **Bhardwaj, E. K., Else, K. J., Rogan, M. T. and Warhurst, G.** (2014). "Increased susceptibility to *Trichuris muris* infection and exacerbation of colitis in *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice." *World J Gastroenterol* 20(7):1797-806.
10. **Bleyer, W. A.** (1978). "The clinical pharmacology of methotrexate: new applications of an old drug." *Cancer* 41(1):36-51.
11. **Bodley, A., Liu, L. F., Israel, M., Seshadri, R., Koseki, Y., Giuliani, F. C., et al.** (1989). "DNA topoisomerase II-mediated interaction of doxorubicin and daunorubicin congeners with DNA." *Cancer Res* 49(21):5969-78.
12. **Borst, P. and Schinkel, A. H.** (2013). "P-glycoprotein ABCB1: a major player in drug handling by mammals." *J Clin Invest* 123(10):4131-3.
13. **Botos, I., Segal, D. M. and Davies, D. R.** (2011). "The structural biology of Toll-like receptors." *Structure* 19(4):447-59.
14. **Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72:248-54.
15. **Brandl, K., Plitas, G., Mihu, C. N., Ubeda, C., Jia, T., Fleisher, M., et al.** (2008). "Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits." *Nature* 455(7214):804-7.
16. **Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. and Goeddel, D. V.** (1996). "TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1." *Nature* 383(6599):443-6.
17. **Cario, E., Gerken, G. and Podolsky, D. K.** (2004). "Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C." *Gastroenterology* 127(1):224-38.

18. **Cario, E. and Podolsky, D. K.** (2005). "Intestinal epithelial TOLLerance versus inTOLLerance of commensals." *Mol Immunol* 42(8):887-93.
19. **Cario, E., Gerken, G. and Podolsky, D. K.** (2007). "Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function." *Gastroenterology* 132(4):1359-74.
20. **Cario, E.** (2010). "Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later." *Inflamm Bowel Dis* 16(9):1583-97.
21. **Carmody, R. J., Ruan, Q., Palmer, S., Hilliard, B. and Chen, Y. H.** (2007). "Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF-kappaB p50 ubiquitination blockade." *Science* 317(5838):675-8.
22. **Cayrol, C. and Girard, J. P.** (2009). "The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(22):9021-6.
23. **Chassaing, B. and Darfeuille-Michaud, A.** (2011). "The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases." *Gastroenterology* 140(6):1720-28.
24. **Chaudhary, P. M. and Roninson, I. B.** (1991). "Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells." *Cell* 66(1):85-94.
25. **Chen, P., Li, J., Barnes, J., Kokkonen, G. C., Lee, J. C. and Liu, Y.** (2002). "Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages." *J Immunol* 169(11):6408-16.
26. **Chen, Z. J.** (2012). "Ubiquitination in signaling to and activation of IKK." *Immunol Rev* 246(1):95-106.
27. **Chi, H., Barry, S. P., Roth, R. J., Wu, J. J., Jones, E. A., Bennett, A. M., et al.** (2006). "Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7):2274-9.
28. **Ciorba, M. A., Riehl, T. E., Rao, M. S., Moon, C., Ee, X., Nava, G. M., et al.** (2012). "Lactobacillus probiotic protects intestinal epithelium from radiation injury in a TLR-2/cyclo-oxygenase-2-dependent manner." *Gut* 61(6):829-38.
29. **Combates, N. J., Rzepka, R. W., Chen, Y. N. and Cohen, D.** (1994). "NF-IL6, a member of the C/EBP family of transcription factors, binds and trans-activates the human MDR1 gene promoter." *J Biol Chem* 269(47):29715-9.
30. **Comerford, K. M., Wallace, T. J., Karhausen, J., Louis, N. A., Montalto, M. C. and Colgan, S. P.** (2002). "Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene." *Cancer Res* 62(12):3387-94.
31. **Croucher, P. J., Mascheretti, S., Foelsch, U. R., Hampe, J. and Schreiber, S.** (2003). "Lack of association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and inflammatory bowel disease in two independent Northern European populations." *Gastroenterology* 125(6):1919-20; author reply 1920-1.
32. **Cutolo, M., Bisso, A., Sulli, A., Felli, L., Briata, M., Pizzorni, C., et al.** (2000). "Antiproliferative and antiinflammatory effects of methotrexate on cultured differentiating myeloid monocytic cells (THP-1) but not on synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 27(11):2551-7.
33. **David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., et al.** (2014). "Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome." *Nature* 505(7484):559-63.



- 
34. **de Graaf, D., Sharma, R. C., Mechetner, E. B., Schimke, R. T. and Roninson, I. B.** (1996). "P-glycoprotein confers methotrexate resistance in 3T6 cells with deficient carrier-mediated methotrexate uptake." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(3):1238-42.
  35. **De Jager, P. L., Franchimont, D., Waliszewska, A., Bitton, A., Cohen, A., Langelier, D., et al.** (2007). "The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases." *Genes Immun* 8(5):387-97.
  36. **de Koning, B. A., van Dieren, J. M., Lindenbergh-Kortleve, D. J., van der Sluis, M., Matsumoto, T., Yamaguchi, K., et al.** (2006). "Contributions of mucosal immune cells to methotrexate-induced mucositis." *Int Immunol* 18(6):941-9.
  37. **de Vos, W. M. and de Vos, E. A.** (2012). "Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation." *Nutr Rev* 70 Suppl 1:S45-56.
  38. **Delia, P., Sansotta, G., Donato, V., Messina, G., Frosina, P., Pergolizzi, S., et al.** (2002). "Prevention of radiation-induced diarrhea with the use of VSL#3, a new high-potency probiotic preparation." *Am J Gastroenterol* 97(8):2150-2.
  39. **Dinarello, C. A.** (2006). "Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process." *Am J Clin Nutr* 83(2):447S-455S.
  40. **Do, K. N., Fink, L. N., Jensen, T. E., Gautier, L. and Parlesak, A.** (2012). "TLR2 controls intestinal carcinogen detoxication by CYP1A1." *PLoS One* 7(3):e32309.
  41. **Du, X., Poltorak, A., Silva, M. and Beutler, B.** (1999). "Analysis of Tlr4-mediated LPS signal transduction in macrophages by mutational modification of the receptor." *Blood Cells Mol Dis* 25(5-6):328-38.
  42. **Elinav, E., Strowig, T., Kau, A. L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C. A., Booth, C. J., et al.** (2011). "NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis." *Cell* 145(5):745-57.
  43. **Ey, B., Eyking, A., Gerken, G., Podolsky, D. K. and Cario, E.** (2009). "TLR2 mediates gap junctional intercellular communication through connexin-43 in intestinal epithelial barrier injury." *J Biol Chem* 284(33):22332-43.
  44. **Ey, B., Eyking, A., Klepak, M., Salzman, N. H., Gothert, J. R., Runzi, M., et al.** (2013). "Loss of TLR2 worsens spontaneous colitis in MDR1A deficiency through commensally induced pyroptosis." *J Immunol* 190(11):5676-88.
  45. **Eyking, A., Ey, B., Runzi, M., Roig, A. I., Reis, H., Schmid, K. W., et al.** (2011). "Toll-like receptor 4 variant D299G induces features of neoplastic progression in Caco-2 intestinal cells and is associated with advanced human colon cancer." *Gastroenterology* 141(6):2154-65.
  46. **Fellay, J., Marzolini, C., Meaden, E. R., Back, D. J., Buclin, T., Chave, J. P., et al.** (2002). "Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study." *Lancet* 359(9300):30-6.
  47. **Ferrary, E., Cohen-Tannoudji, M., Pehau-Arnaudet, G., Lapillonne, A., Athman, R., Ruiz, T., et al.** (1999). "In vivo, villin is required for Ca(2+)-dependent F-actin disruption in intestinal brush borders." *J Cell Biol* 146(4):819-30.
  48. **Fiedler, T., Buning, C., Reuter, W., Pitre, G., Gentz, E., Schmidt, H. H., et al.** (2007). "Possible role of MDR1 two-locus genotypes for young-age onset ulcerative colitis but not Crohn's disease." *Eur J Clin Pharmacol* 63(10):917-25.

49. **Figueiredo, N., Chora, A., Raquel, H., Pejanovic, N., Pereira, P., Hartleben, B., et al.** (2013). "Anthracyclines induce DNA damage response-mediated protection against severe sepsis." *Immunity* 39(5):874-84.
50. **Fleming, T. J., Fleming, M. L. and Malek, T. R.** (1993). "Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family." *J Immunol* 151(5):2399-408.
51. **Frank, D. N., St Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N. and Pace, N. R.** (2007). "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(34):13780-5.
52. **Frank, M., Hennenberg, E. M., Eyking, A., Runzi, M., Gerken, G., Scott, P., et al.** (2015). "TLR signaling modulates side effects of anticancer therapy in the small intestine." *J Immunol* 194(4):1983-95.
53. **Fukata, M., Chen, A., Klepper, A., Krishnareddy, S., Vamadevan, A. S., Thomas, L. S., et al.** (2006). "Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine." *Gastroenterology* 131(3):862-77.
54. **Furuno, T., Landi, M. T., Ceroni, M., Caporaso, N., Bernucci, I., Nappi, G., et al.** (2002). "Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease." *Pharmacogenetics* 12(7):529-34.
55. **Garcia, M. G., Alaniz, L., Lopes, E. C., Blanco, G., Hajos, S. E. and Alvarez, E.** (2005). "Inhibition of NF-kappaB activity by BAY 11-7082 increases apoptosis in multidrug resistant leukemic T-cell lines." *Leuk Res* 29(12):1425-34.
56. **Gay, N. J., Symmons, M. F., Gangloff, M. and Bryant, C. E.** (2014). "Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes." *Nat Rev Immunol* 14(8):546-58.
57. **Geick, A., Eichelbaum, M. and Burk, O.** (2001). "Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin." *J Biol Chem* 276(18):14581-7.
58. **Gottesman, M. M., Fojo, T. and Bates, S. E.** (2002). "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters." *Nat Rev Cancer* 2(1):48-58.
59. **Grenier, J. M., Wang, L., Manji, G. A., Huang, W. J., Al-Garawi, A., Kelly, R., et al.** (2002). "Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1." *FEBS Lett* 530(1-3):73-8.
60. **Grybauskas, A., Koga, T., Kuprys, P. V., Nolan, M., McCarty, R., Walker, L., et al.** (2015). "ABCB1 transporter and Toll-like receptor 4 in trabecular meshwork cells." *Mol Vis* 21:201-12.
61. **Gu, S., Chen, D., Zhang, J. N., Lv, X., Wang, K., Duan, L. P., et al.** (2013). "Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract." *PLoS One* 8(10):e74957.
62. **Guabiraba, R., Besnard, A. G., Menezes, G. B., Secher, T., Jabir, M. S., Amaral, S. S., et al.** (2014). "IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice." *Mucosal Immunol* 7(5):1079-93.
63. **Guengerich, F. P.** (2006). "Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity." *Aaps J* 8(1):E101-11.

- 
64. **Haerian, B. S., Roslan, H., Raymond, A. A., Tan, C. T., Lim, K. S., Zulkifli, S. Z., et al.** (2010). "ABCB1 C3435T polymorphism and the risk of resistance to antiepileptic drugs in epilepsy: a systematic review and meta-analysis." *Seizure* 19(6):339-46.
65. **Halbleib, J. M., Saaf, A. M., Brown, P. O. and Nelson, W. J.** (2007). "Transcriptional modulation of genes encoding structural characteristics of differentiating enterocytes during development of a polarized epithelium in vitro." *Mol Biol Cell* 18(11):4261-78.
66. **Ho, G. T., Moodie, F. M. and Satsangi, J.** (2003). "Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease?" *Gut* 52(5):759-66.
67. **Ho, G. T., Nimmo, E. R., Tenesa, A., Fennell, J., Drummond, H., Mowat, C., et al.** (2005). "Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis." *Gastroenterology* 128(2):288-96.
68. **Hoffmann, U. and Kroemer, H. K.** (2004). "The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance." *Drug Metab Rev* 36(3-4):669-701.
69. **Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H. P., Brockmoller, J., Johne, A., et al.** (2000). "Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7):3473-8.
70. **Hooijberg, J. H., Broxterman, H. J., Kool, M., Assaraf, Y. G., Peters, G. J., Noordhuis, P., et al.** (1999). "Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2." *Cancer Res* 59(11):2532-5.
71. **Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G. and Gordon, J. I.** (2001). "Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine." *Science* 291(5505):881-4.
72. **Hunter, J., Jepson, M. A., Tsuruo, T., Simmons, N. L. and Hirst, B. H.** (1993). "Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators." *J Biol Chem* 268(20):14991-7.
73. **Iida, N., Dzutsev, A., Stewart, C. A., Smith, L., Bouladoux, N., Weingarten, R. A., et al.** (2013). "Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment." *Science* 342(6161):967-70.
74. **Illmer, T., Schuler, U. S., Thiede, C., Schwarz, U. I., Kim, R. B., Gotthard, S., et al.** (2002). "MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients." *Cancer Res* 62(17):4955-62.
75. **Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S. and Tsukita, S.** (1997). "Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments." *J Cell Biol* 138(1):181-92.
76. **Jiang, Z., Mak, T. W., Sen, G. and Li, X.** (2004). "Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10):3533-8.
77. **Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., et al.** (2007). "Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide." *Cell* 130(6):1071-82.

- 
78. **Jin, S. and Scotto, K. W.** (1998). "Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y." *Mol Cell Biol* 18(7):4377-84.
79. **Juliano, R. L. and Ling, V.** (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." *Biochim Biophys Acta* 455(1):152-62.
80. **Justino, P. F., Melo, L. F., Nogueira, A. F., Morais, C. M., Mendes, W. O., Franco, A. X., et al.** (2015). "Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice." *Cancer Chemother Pharmacol* 75(3):559-67.
81. **Kaczmarek, A., Brinkman, B. M., Heyndrickx, L., Vandenabeele, P. and Krysko, D. V.** (2012). "Severity of doxorubicin-induced small intestinal mucositis is regulated by the TLR-2 and TLR-9 pathways." *J Pathol* 226(4):598-608.
82. **Kaiko, G. E. and Stappenbeck, T. S.** (2014). "Host-microbe interactions shaping the gastrointestinal environment." *Trends Immunol* 35(11):538-48.
83. **Kanayama, A., Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., Hong, M., Shaito, A., et al.** (2004). "TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains." *Mol Cell* 15(4):535-48.
84. **Kantari, C., Pederzoli-Ribeil, M. and Witko-Sarsat, V.** (2008). "The role of neutrophils and monocytes in innate immunity." *Contrib Microbiol* 15:118-46.
85. **Kast, H. R., Goodwin, B., Tarr, P. T., Jones, S. A., Anisfeld, A. M., Stoltz, C. M., et al.** (2002). "Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor." *J Biol Chem* 277(4):2908-15.
86. **Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E. and Poirier, G. G.** (1993). "Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis." *Cancer Res* 53(17):3976-85.
87. **Kawai, T. and Akira, S.** (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* 11(5):373-84.
88. **Kawasaki, T. and Kawai, T.** (2014). "Toll-like receptor signaling pathways." *Front Immunol* 5:461.
89. **Kelly, D., Campbell, J. I., King, T. P., Grant, G., Jansson, E. A., Coutts, A. G., et al.** (2004). "Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA." *Nat Immunol* 5(1):104-12.
90. **Kim, S. H., Lee, S. H., Kwak, N. H., Kang, C. D. and Chung, B. S.** (1996). "Effect of the activated Raf protein kinase on the human multidrug resistance 1 (MDR1) gene promoter." *Cancer Lett* 98(2):199-205.
91. **Kim, S. H., Yeo, G. S., Lim, Y. S., Kang, C. D., Kim, C. M. and Chung, B. S.** (1998). "Suppression of multidrug resistance via inhibition of heat shock factor by quercetin in MDR cells." *Exp Mol Med* 30(2):87-92.
92. **Kim, Y. K., Song, Y. J., Seo, D. W., Kang, D. W., Lee, H. Y., Rhee, D. K., et al.** (2007). "Reversal of multidrug resistance by 4-chloro-N-(3-((E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acryloyl)phenyl)benzamide through the reversible inhibition of P-glycoprotein." *Biochem Biophys Res Commun* 355(1):136-42.
93. **Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R. and Flavell, R. A.** (2002). "IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling." *Cell* 110(2):191-202.

- 
94. **Kolls, J. K. and Linden, A.** (2004). "Interleukin-17 family members and inflammation." *Immunity* 21(4):467-76.
  95. **Labbe, K. and Saleh, M.** (2008). "Cell death in the host response to infection." *Cell Death Differ* 15(9):1339-49.
  96. **Labialle, S., Gayet, L., Marthinet, E., Rigal, D. and Baggetto, L. G.** (2002). "Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views." *Biochem Pharmacol* 64(5-6):943-8.
  97. **Lalla, R. V., Bowen, J., Barasch, A., Elting, L., Epstein, J., Keefe, D. M., et al.** (2014). "MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy." *Cancer* 120(10):1453-61.
  98. **Lankelma, J. M., Nieuwdorp, M., de Vos, W. M. and Wiersinga, W. J.** (2015). "The gut microbiota in internal medicine: implications for health and disease." *Neth J Med* 73(2):61-8.
  99. **Lee, S., Choi, E. J., Jin, C. and Kim, D. H.** (2005). "Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line." *Gynecol Oncol* 97(1):26-34.
  100. **Lemaire, S., Van Bambeke, F., Mingeot-Leclercq, M. P. and Tulkens, P. M.** (2007). "Modulation of the cellular accumulation and intracellular activity of daptomycin towards phagocytized *Staphylococcus aureus* by the P-glycoprotein (MDR1) efflux transporter in human THP-1 macrophages and madin-darby canine kidney cells." *Antimicrob Agents Chemother* 51(8):2748-57.
  101. **Lencioni, K. C., Seamons, A., Treuting, P. M., Maggio-Price, L. and Brabb, T.** (2008). "Murine norovirus: an intercurrent variable in a mouse model of bacteria-induced inflammatory bowel disease." *Comp Med* 58(6):522-33.
  102. **Lin, Y. C., Ellingrod, V. L., Bishop, J. R. and Miller, D. D.** (2006). "The relationship between P-glycoprotein (PGP) polymorphisms and response to olanzapine treatment in schizophrenia." *Ther Drug Monit* 28(5):668-72.
  103. **Linton, K. J.** (2007). "Structure and function of ABC transporters." *Physiology (Bethesda)* 22:122-30.
  104. **Litman, T., Druley, T. E., Stein, W. D. and Bates, S. E.** (2001). "From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance." *Cell Mol Life Sci* 58(7):931-59.
  105. **Liu, M., Li, D., Aneja, R., Joshi, H. C., Xie, S., Zhang, C., et al.** (2007). "PO(2)-dependent differential regulation of multidrug resistance 1 gene expression by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway." *J Biol Chem* 282(24):17581-6.
  106. **Loo, T. W., Bartlett, M. C. and Clarke, D. M.** (2006). "Transmembrane segment 1 of human P-glycoprotein contributes to the drug-binding pocket." *Biochem J* 396(3):537-45.
  107. **Lorenz, E., Mira, J. P., Cornish, K. L., Arbour, N. C. and Schwartz, D. A.** (2000). "A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection." *Infect Immun* 68(11):6398-401.
  108. **Lotze, M. T., Zeh, H. J., Rubartelli, A., Sparvero, L. J., Amoscato, A. A., Washburn, N. R., et al.** (2007). "The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity." *Immunol Rev* 220:60-81.
  109. **MacDonald, T. T., Monteleone, I., Fantini, M. C. and Monteleone, G.** (2011). "Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine." *Gastroenterology* 140(6):1768-75.

- 
110. **Maggio-Price, L., Shows, D., Waggle, K., Burich, A., Zeng, W., Escobar, S., et al.** (2002). "Helicobacter bilis infection accelerates and H. hepaticus infection delays the development of colitis in multiple drug resistance-deficient (mdr1a<sup>-/-</sup>) mice." *Am J Pathol* 160(2):739-51.
  111. **Maglich, J. M., Stoltz, C. M., Goodwin, B., Hawkins-Brown, D., Moore, J. T. and Kliewer, S. A.** (2002). "Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification." *Mol Pharmacol* 62(3):638-46.
  112. **Maher, J. M., Slitt, A. L., Cherrington, N. J., Cheng, X. and Klaassen, C. D.** (2005). "Tissue distribution and hepatic and renal ontogeny of the multidrug resistance-associated protein (Mrp) family in mice." *Drug Metab Dispos* 33(7):947-55.
  113. **Majumdar, S. and Aggarwal, B. B.** (2001). "Methotrexate suppresses NF-kappaB activation through inhibition of IkappaBalpha phosphorylation and degradation." *J Immunol* 167(5):2911-20.
  114. **Manichanh, C., Reeder, J., Gibert, P., Varela, E., Llopis, M., Antolin, M., et al.** (2010). "Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake." *Genome Res* 20(10):1411-9.
  115. **Maroux, S., Coudrier, E., Feracci, H., Gorvel, J. P. and Louvard, D.** (1988). "Molecular organization of the intestinal brush border." *Biochimie* 70(9):1297-306.
  116. **Marthinet, E., Divita, G., Bernaud, J., Rigal, D. and Baggetto, L. G.** (2000). "Modulation of the typical multidrug resistance phenotype by targeting the MED-1 region of human MDR1 promoter." *Gene Ther* 7(14):1224-33.
  117. **Martinez, C., Antolin, M., Santos, J., Torrejon, A., Casellas, F., Borrueal, N., et al.** (2008). "Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission." *Am J Gastroenterol* 103(3):643-8.
  118. **Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., et al.** (2005). "ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity." *Nat Immunol* 6(6):587-92.
  119. **McCormack, G., Moriarty, D., O'Donoghue, D. P., McCormick, P. A., Sheahan, K. and Baird, A. W.** (2001). "Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease." *Inflamm Res* 50(10):491-5.
  120. **Medina, C. and Radomski, M. W.** (2006). "Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation." *J Pharmacol Exp Ther* 318(3):933-8.
  121. **Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A., Jr.** (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature* 388(6640):394-7.
  122. **Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., et al.** (1998). "MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways." *Mol Cell* 2(2):253-8.
  123. **Medzhitov, R. and Janeway, C. A., Jr.** (2002). "Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system." *Science* 296(5566):298-300.
  124. **Mellet, M., Atzei, P., Jackson, R., O'Neill, L. A. and Moynagh, P. N.** (2011). "Mal mediates TLR-induced activation of CREB and expression of IL-10." *J Immunol* 186(8):4925-35.
  125. **Mukherjee, S. and Hooper, L. V.** (2015). "Antimicrobial defense of the intestine." *Immunity* 42(1):28-39.

- 
126. **Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., et al.** (2002). "Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution." *Nat Immunol* 3(7):667-72.
  127. **Nasi, M., Borghi, V., Pinti, M., Bellodi, C., Lugli, E., Maffei, S., et al.** (2003). "MDR1 C3435T genetic polymorphism does not influence the response to antiretroviral therapy in drug-naïve HIV-positive patients." *Aids* 17(11):1696-8.
  128. **Neudeck, B. L., Loeb, J. M., Faith, N. G. and Czuprynski, C. J.** (2004). "Intestinal P glycoprotein acts as a natural defense mechanism against *Listeria monocytogenes*." *Infect Immun* 72(7):3849-54.
  129. **Nones, K., Knoch, B., Dommels, Y. E., Paturi, G., Butts, C., McNabb, W. C., et al.** (2009). "Multidrug resistance gene deficient (*mdr1a*<sup>-/-</sup>) mice have an altered caecal microbiota that precedes the onset of intestinal inflammation." *J Appl Microbiol* 107(2):557-66.
  130. **Normand, S., Delanoye-Crespin, A., Bressenot, A., Huot, L., Grandjean, T., Peyrin-Biroulet, L., et al.** (2011). "Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(23):9601-6.
  131. **Ogretmen, B. and Safa, A. R.** (1999). "Negative regulation of MDR1 promoter activity in MCF-7, but not in multidrug resistant MCF-7/Adr, cells by cross-coupled NF-kappa B/p65 and c-Fos transcription factors and their interaction with the CAAT region." *Biochemistry* 38(7):2189-99.
  132. **Ogretmen, B. and Safa, A. R.** (2000). "Identification and characterization of the MDR1 promoter-enhancing factor 1 (MEF1) in the multidrug resistant HL60/VCR human acute myeloid leukemia cell line." *Biochemistry* 39(1):194-204.
  133. **Onnie, C. M., Fisher, S. A., Pattni, R., Sanderson, J., Forbes, A., Lewis, C. M., et al.** (2006). "Associations of allelic variants of the multidrug resistance gene (*ABCB1* or *MDR1*) and inflammatory bowel disease and their effects on disease behavior: a case-control and meta-analysis study." *Inflamm Bowel Dis* 12(4):263-71.
  134. **Osborn, M. T. and Chambers, T. C.** (1996). "Role of the stress-activated/c-Jun NH2-terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin and other chemotherapeutic drugs." *J Biol Chem* 271(48):30950-5.
  135. **Oshima, N., Ishihara, S., Rumi, M. A., Aziz, M. M., Mishima, Y., Kadota, C., et al.** (2010). "A20 is an early responding negative regulator of Toll-like receptor 5 signalling in intestinal epithelial cells during inflammation." *Clin Exp Immunol* 159(2):185-98.
  136. **Osterlund, P., Ruotsalainen, T., Korpela, R., Saxelin, M., Ollus, A., Valta, P., et al.** (2007). "Lactobacillus supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: a randomised study." *Br J Cancer* 97(8):1028-34.
  137. **Otte, J. M., Cario, E. and Podolsky, D. K.** (2004). "Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells." *Gastroenterology* 126(4):1054-70.
  138. **Pacold, M. E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C. T., Walker, E. H., et al.** (2000). "Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma." *Cell* 103(6):931-43.
  139. **Page-McCaw, A., Ewald, A. J. and Werb, Z.** (2007). "Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(3):221-33.

140. **Paik, J., Fierce, Y., Treuting, P. M., Brabb, T. and Maggio-Price, L.** (2013). "High-fat diet-induced obesity exacerbates inflammatory bowel disease in genetically susceptible Mdr1a<sup>-/-</sup> male mice." *J Nutr* 143(8):1240-7.
141. **Panwala, C. M., Jones, J. C. and Viney, J. L.** (1998). "A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, mdr1a, spontaneously develop colitis." *J Immunol* 161(10):5733-44.
142. **Parihar, A., Eubank, T. D. and Doseff, A. I.** (2010). "Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death." *J Innate Immun* 2(3):204-15.
143. **Parks, W. C., Wilson, C. L. and Lopez-Boado, Y. S.** (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." *Nat Rev Immunol* 4(8):617-29.
144. **Patel, V. A., Dunn, M. J. and Sorokin, A.** (2002). "Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2." *J Biol Chem* 277(41):38915-20.
145. **Pauli-Magnus, C. and Kroetz, D. L.** (2004). "Functional implications of genetic polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1)." *Pharm Res* 21(6):904-13.
146. **Peterson, L. W. and Artis, D.** (2014). "Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis." *Nat Rev Immunol* 14(3):141-53.
147. **Phong, M. S., Van Horn, R. D., Li, S., Tucker-Kellogg, G., Surana, U. and Ye, X. S.** (2010). "p38 mitogen-activated protein kinase promotes cell survival in response to DNA damage but is not required for the G(2) DNA damage checkpoint in human cancer cells." *Mol Cell Biol* 30(15):3816-26.
148. **Pierik, M., Joossens, S., Van Steen, K., Van Schuerbeek, N., Vlietinck, R., Rutgeerts, P., et al.** (2006). "Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases." *Inflamm Bowel Dis* 12(1):1-8.
149. **Pinkus, G. S. and Pinkus, J. L.** (1991). "Myeloperoxidase: a specific marker for myeloid cells in paraffin sections." *Mod Pathol* 4(6):733-41.
150. **Podolsky, D. K.** (1993). "Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions." *Am J Physiol* 264(2 Pt 1):G179-86.
151. **Podolsky, D. K., Gerken, G., Eyking, A. and Cario, E.** (2009). "Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency." *Gastroenterology* 137(1):209-20.
152. **Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., et al.** (2010). "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing." *Nature* 464(7285):59-65.
153. **Raber-Durlacher, J. E., Weijl, N. I., Abu Saris, M., de Koning, B., Zwinderman, A. H. and Osanto, S.** (2000). "Oral mucositis in patients treated with chemotherapy for solid tumors: a retrospective analysis of 150 cases." *Support Care Cancer* 8(5):366-71.
154. **Resta-Lenert, S., Smitham, J. and Barrett, K. E.** (2005). "Epithelial dysfunction associated with the development of colitis in conventionally housed mdr1a<sup>-/-</sup> mice." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289(1):G153-62.
155. **Roach, J. M., Racioppi, L., Jones, C. D. and Masci, A. M.** (2013). "Phylogeny of Toll-like receptor signaling: adapting the innate response." *PLoS One* 8(1):e54156.



156. **Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. and Bonner, W. M.** (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." *J Biol Chem* 273(10):5858-68.
157. **Ross, J. R., Riley, J., Taegetmeyer, A. B., Sato, H., Gretton, S., du Bois, R. M., et al.** (2008). "Genetic variation and response to morphine in cancer patients: catechol-O-methyltransferase and multidrug resistance-1 gene polymorphisms are associated with central side effects." *Cancer* 112(6):1390-403.
158. **Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T. A., et al.** (2011). "The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota." *Science* 332(6032):974-7.
159. **Rubenstein, E. B., Peterson, D. E., Schubert, M., Keefe, D., McGuire, D., Epstein, J., et al.** (2004). "Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis." *Cancer* 100(9 Suppl):2026-46.
160. **Salzman, N. H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjoberg, J., Amir, E., et al.** (2010). "Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology." *Nat Immunol* 11(1):76-83.
161. **Sane, R., Wu, S. P., Zhang, R. and Gallo, J. M.** (2014). "The effect of ABCG2 and ABCC4 on the pharmacokinetics of methotrexate in the brain." *Drug Metab Dispos* 42(4):537-40.
162. **Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G. and Varadi, A.** (2006). "Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system." *Physiol Rev* 86(4):1179-236.
163. **Sartor, R. B.** (2008). "Microbial influences in inflammatory bowel diseases." *Gastroenterology* 134(2):577-94.
164. **Schenk, M., Belisle, J. T. and Modlin, R. L.** (2009). "TLR2 looks at lipoproteins." *Immunity* 31(6):847-9.
165. **Schinkel, A. H., Smit, J. J., van Tellingen, O., Beijnen, J. H., Wagenaar, E., van Deemter, L., et al.** (1994). "Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs." *Cell* 77(4):491-502.
166. **Schinkel, A. H. and Jonker, J. W.** (2003). "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview." *Adv Drug Deliv Rev* 55(1):3-29.
167. **Schroder, N. W. J., Hermann, C., Hamann, L., Gobel, U. B., Hartung, T. and Schumann, R. R.** (2003). "High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR." *J Mol Med-Jmm* 81(6):368-372.
168. **Schroll, A., Eller, K., Feistritzer, C., Nairz, M., Sonnweber, T., Moser, P. A., et al.** (2012). "Lipocalin-2 ameliorates granulocyte functionality." *Eur J Immunol* 42(12):3346-57.
169. **Schweitzer, B. I., Dicker, A. P. and Bertino, J. R.** (1990). "Dihydrofolate reductase as a therapeutic target." *Faseb J* 4(8):2441-52.
170. **Scotto, K. W.** (2003). "Transcriptional regulation of ABC drug transporters." *Oncogene* 22(47):7496-511.
171. **Sharma, A., Houshyar, R., Bhosale, P., Choi, J. I., Gulati, R. and Lall, C.** (2014). "Chemotherapy induced liver abnormalities: an imaging perspective." *Clin Mol Hepatol* 20(3):317-26.

172. **Shea, B., Swinden, M. V., Ghogomu, E. T., Ortiz, Z., Katchamart, W., Rader, T., et al.** (2014). "Folic acid and folinic acid for reducing side effects in patients receiving methotrexate for rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 41(6):1049-60.
173. **Shi, M., Deng, W., Bi, E., Mao, K., Ji, Y., Lin, G., et al.** (2008). "TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation." *Nat Immunol* 9(4):369-77.
174. **Siccardi, D., Mummy, K. L., Wall, D. M., Bien, J. D. and McCormick, B. A.** (2008). "Salmonella enterica serovar Typhimurium modulates P-glycoprotein in the intestinal epithelium." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(6):G1392-400.
175. **Siednienko, J. and Miggin, S. M.** (2009). "Expression analysis of the Toll-like receptors in human peripheral blood mononuclear cells." *Methods Mol Biol* 517:3-14.
176. **Sloan, J. A., Loprinzi, C. L., Novotny, P. J., Okuno, S., Nair, S. and Barton, D. L.** (2000). "Sex differences in fluorouracil-induced stomatitis." *J Clin Oncol* 18(2):412-20.
177. **Smith, P. D., Smythies, L. E., Shen, R., Greenwell-Wild, T., Gliozzi, M. and Wahl, S. M.** (2011). "Intestinal macrophages and response to microbial encroachment." *Mucosal Immunol* 4(1):31-42.
178. **Smyth, M. J., Krasovskis, E., Sutton, V. R. and Johnstone, R. W.** (1998). "The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12):7024-9.
179. **Sonis, S. T.** (1998). "Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity." *Oral Oncol* 34(1):39-43.
180. **Sonis, S. T.** (2004). "The pathobiology of mucositis." *Nat Rev Cancer* 4(4):277-84.
181. **Sonis, S. T.** (2004). "A biological approach to mucositis." *J Support Oncol* 2(1):21-32; discussion 35-6.
182. **Sonis, S. T., Elting, L. S., Keefe, D., Peterson, D. E., Schubert, M., Hauer-Jensen, M., et al.** (2004). "Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients." *Cancer* 100(9 Suppl):1995-2025.
183. **Sparreboom, A., van Asperen, J., Mayer, U., Schinkel, A. H., Smit, J. W., Meijer, D. K., et al.** (1997). "Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(5):2031-5.
184. **Spor, A., Koren, O. and Ley, R.** (2011). "Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome." *Nat Rev Microbiol* 9(4):279-90.
185. **Staley, E. M., Dimmitt, R. A., Schoeb, T. R., Tanner, S. M. and Lorenz, R. G.** (2011). "Critical role for P-glycoprotein expression in hematopoietic cells in the FVB.Mdr1a(-/-) model of colitis." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 53(6):666-73.
186. **Stecher, B., Chaffron, S., Kappeli, R., Hapfelmeier, S., Friedrich, S., Weber, T. C., et al.** (2010). "Like will to like: abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal colonization by pathogenic and commensal bacteria." *PLoS Pathog* 6(1):e1000711.

187. **Stockinger, S., Duerr, C. U., Fulde, M., Dolowschiak, T., Pott, J., Yang, I., et al.** (2014). "TRIF signaling drives homeostatic intestinal epithelial antimicrobial peptide expression." *J Immunol* 193(8):4223-34.
188. **Stringer, A. M., Al-Dasooqi, N., Bowen, J. M., Tan, T. H., Radzuan, M., Logan, R. M., et al.** (2013). "Biomarkers of chemotherapy-induced diarrhoea: a clinical study of intestinal microbiome alterations, inflammation and circulating matrix metalloproteinases." *Support Care Cancer* 21(7):1843-52.
189. **Sukhai, M. and Piquette-Miller, M.** (2000). "Regulation of the multidrug resistance genes by stress signals." *J Pharm Pharm Sci* 3(2):268-80.
190. **Sundseth, R., MacDonald, G., Ting, J. and King, A. C.** (1997). "DNA elements recognizing NF-Y and Sp1 regulate the human multidrug-resistance gene promoter." *Mol Pharmacol* 51(6):963-71.
191. **Tacke, F. and Randolph, G. J.** (2006). "Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets." *Immunobiology* 211(6-8):609-18.
192. **Takagi, H., Kanai, T., Okazawa, A., Kishi, Y., Sato, T., Takaishi, H., et al.** (2003). "Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the development of dextran sodium sulphate colitis in mice." *Scand J Gastroenterol* 38(8):837-44.
193. **Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., et al.** (2002). "Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins." *J Immunol* 169(1):10-4.
194. **Tanner, S. M., Staley, E. M. and Lorenz, R. G.** (2013). "Altered generation of induced regulatory T cells in the FVB.mdr1a/- mouse model of colitis." *Mucosal Immunol* 6(2):309-23.
195. **Thomas, J. A., Allen, J. L., Tsen, M., Dubnicoff, T., Danao, J., Liao, X. C., et al.** (1999). "Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase." *J Immunol* 163(2):978-84.
196. **Thottassery, J. V., Zambetti, G. P., Arimori, K., Schuetz, E. G. and Schuetz, J. D.** (1997). "p53-dependent regulation of MDR1 gene expression causes selective resistance to chemotherapeutic agents." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20):11037-42.
197. **Tom, B. H., Rutzky, L. P., Jakstys, M. M., Oyasu, R., Kaye, C. I. and Kahan, B. D.** (1976). "Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line." *In Vitro* 12(3):180-91.
198. **Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T. and Tada, K.** (1980). "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)." *Int J Cancer* 26(2):171-6.
199. **Ubeda, C., Lipuma, L., Gobourne, A., Viale, A., Leiner, I., Equinda, M., et al.** (2012). "Familial transmission rather than defective innate immunity shapes the distinct intestinal microbiota of TLR-deficient mice." *J Exp Med* 209(8):1445-56.
200. **Uchino, Y., Iriyama, N., Hatta, Y. and Takei, M.** (2015). "Granulocyte colony-stimulating factor potentiates all-trans retinoic acid-induced granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cell line HT93A." *Cancer Cell Int* 15:30.
201. **Urbancsek, H., Kazar, T., Mezes, I. and Neumann, K.** (2001). "Results of a double-blind, randomized study to evaluate the efficacy and safety of Antibiophilus in patients with radiation-induced diarrhoea." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13(4):391-6.

- 
202. **van Groenigen, M., Valentijn, L. J. and Baas, F.** (1993). "Identification of a functional initiator sequence in the human MDR1 promoter." *Biochim Biophys Acta* 1172(1-2):138-46.
203. **van Vliet, M. J., Tissing, W. J., Dun, C. A., Meessen, N. E., Kamps, W. A., de Bont, E. S., et al.** (2009). "Chemotherapy treatment in pediatric patients with acute myeloid leukemia receiving antimicrobial prophylaxis leads to a relative increase of colonization with potentially pathogenic bacteria in the gut." *Clin Infect Dis* 49(2):262-70.
204. **van Vliet, M. J., Harmsen, H. J., de Bont, E. S. and Tissing, W. J.** (2010). "The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis." *PLoS Pathog* 6(5):e1000879.
205. **Varma, M. V., Ashokraj, Y., Dey, C. S. and Panchagnula, R.** (2003). "P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement." *Pharmacol Res* 48(4):347-59.
206. **Venkatesh, M., Mukherjee, S., Wang, H., Li, H., Sun, K., Benechet, A. P., et al.** (2014). "Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4." *Immunity* 41(2):296-310.
207. **Vermes, A., Guchelaar, H. J. and Koopmans, R. P.** (1997). "Individualization of cancer therapy based on cytochrome P450 polymorphism: a pharmacogenetic approach." *Cancer Treat Rev* 23(5-6):321-39.
208. **Viaud, S., Saccheri, F., Mignot, G., Yamazaki, T., Daillere, R., Hannani, D., et al.** (2013). "The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide." *Science* 342(6161):971-6.
209. **Vijay-Kumar, M., Aitken, J. D., Carvalho, F. A., Cullender, T. C., Mwangi, S., Srinivasan, S., et al.** (2010). "Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5." *Science* 328(5975):228-31.
210. **Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J. and Chen, Z. J.** (2001). "TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK." *Nature* 412(6844):346-51.
211. **Wang, D. and Sadée, W.** (2006). "Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1)." *Aaps J* 8(3):E515-20.
212. **Wang, J., Ford, H. R. and Grishin, A. V.** (2010). "NF-kappaB-mediated expression of MAPK phosphatase-1 is an early step in desensitization to TLR ligands in enterocytes." *Mucosal Immunol* 3(5):523-34.
213. **Wang, L. H., Song, Y. B., Zheng, W. L., Jiang, L. and Ma, W. L.** (2013). "The association between polymorphisms in the MDR1 gene and risk of cancer: a systematic review and pooled analysis of 52 case-control studies." *Cancer Cell Int* 13(1):46.
214. **Wardill, H. R., Van Seille, Y. Z., Mander, K. A., Gibson, R. J., Logan, R. M., Bowen, J. M., et al.** (2015). "Toll-like receptor 4 signaling: a common biological mechanism of regimen-related toxicities: an emerging hypothesis for neuropathy and gastrointestinal toxicity." *Cancer Treat Rev* 41(2):122-8.
215. **Washington, H. G.** (1984). "Diversity, Biotic and Similarity Indices." *Water Res.* 18(6):653-94.
216. **Whitmarsh, A. J. and Davis, R. J.** (1996). "Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways." *J Mol Med (Berl)* 74(10):589-607.

- 
217. **Wolf, S. J., Bachtiar, M., Wang, J., Sim, T. S., Chong, S. S. and Lee, C. G.** (2011). "An update on ABCB1 pharmacogenetics: insights from a 3D model into the location and evolutionary conservation of residues corresponding to SNPs associated with drug pharmacokinetics." *Pharmacogenomics J* 11(5):315-25.
218. **Wooten, R. M., Ma, Y., Yoder, R. A., Brown, J. P., Weis, J. H., Zachary, J. F., et al.** (2002). "Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*." *J Immunol* 168(1):348-55.
219. **Xia, Z., Guo, M., Liu, H., Jiang, L., Li, Q., Peng, J., et al.** (2015). "CBP-dependent Wnt/beta-catenin signaling is crucial in regulation of MDR1 transcription." *Curr Cancer Drug Targets*
220. **Xiao, H., Gulen, M. F., Qin, J., Yao, J., Bulek, K., Kish, D., et al.** (2007). "The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis." *Immunity* 26(4):461-75.
221. **Yamada, T., Takaoka, A. S., Naishiro, Y., Hayashi, R., Maruyama, K., Maesawa, C., et al.** (2000). "Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis." *Cancer Res* 60(17):4761-6.
222. **Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., et al.** (2002). "Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling." *J Immunol* 169(12):6668-72.
223. **Yang, J. M., Vassil, A. D. and Hait, W. N.** (2001). "Activation of phospholipase C induces the expression of the multidrug resistance (MDR1) gene through the Raf-MAPK pathway." *Mol Pharmacol* 60(4):674-80.
224. **Yang, Z., Wu, D., Bui, T. and Ho, R. J.** (2008). "A novel human multidrug resistance gene MDR1 variant G571A (G191R) modulates cancer drug resistance and efflux transport." *J Pharmacol Exp Ther* 327(2):474-81.
225. **Yasuda, K., Lan, L. B., Sanglard, D., Furuya, K., Schuetz, J. D. and Schuetz, E. G.** (2002). "Interaction of cytochrome P450 3A inhibitors with P-glycoprotein." *J Pharmacol Exp Ther* 303(1):323-32.
226. **Yasuda, M., Kato, S., Yamanaka, N., Iimori, M., Matsumoto, K., Utsumi, D., et al.** (2013). "5-HT(3) receptor antagonists ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppression of apoptosis in murine intestinal crypt cells." *Br J Pharmacol* 168(6):1388-400.
227. **Zarembek, K. A. and Godowski, P. J.** (2002). "Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines." *J Immunol* 168(2):554-61.
228. **Zhao, J., Kim, K. A., De Vera, J., Palencia, S., Wagle, M. and Abo, A.** (2009). "R-Spondin1 protects mice from chemotherapy or radiation-induced oral mucositis through the canonical Wnt/beta-catenin pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(7):2331-6.

## **Internetquellen**

1. [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich während meiner Promotion fortwährend unterstützt haben.

Als allererstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Guido Gerken und Prof. Dr. Elke Cario für die Möglichkeit zur Promotion und für die interessante Aufgabenstellung bedanken. Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Elke Cario für die intensive und persönliche Betreuung, für hilfreiche Diskussionen sowie für die Möglichkeit meine Daten zu veröffentlichen.

Des Weiteren danke ich meinen Arbeitskolleginnen Frederike Bartsch, Birgit Ey, Annette Eyking und Eva-Maria Hennenberg für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung während der Promotion.

Dr. Alan Walker, Dr. Julian Parkhill und Paul Scott danke ich für die Durchführung der Bakterienanalyse des Mäusestuhls.

Bei Daria Niewrzol, Daniel Frank und Stephan Frank bedanke ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für die helfenden Ratschläge, die er als großer Bruder stets für mich hatte, bedanke ich mich bei Peter Klepak.

Ich danke meinem Mann, Alexander Frank, der mich während der ganzen Zeit der Promotion stets motiviert und unterstützt hat.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir auch in schweren Zeiten Rückhalt gaben und immer für mich da waren und sein werden.

## **Lebenslauf**

Aus Gründen des Datenschutzes ist der Lebenslauf in der elektronischen Version dieser Arbeit nicht enthalten.



---

## Erklärung

### Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Modulation der angeborenen Immunität in der Pathophysiologie der Chemotherapie-induzierten intestinalen Mukositis*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Dipl. Biol. Magdalena Frank befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_ Prof. Dr. med. Elke Cario  
Name/Unterschrift des wissenschaftlichen Betreuers/  
Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

### Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_  
Unterschrift der Doktorandin

### Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, e und g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den \_\_\_\_\_  
Unterschrift der Doktorandin